

SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN VON 5-THIAFLAVINEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rolf Grauert
aus Berlin

Berlin 1976

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0018

SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN VON 5-THIAFLAVINEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rolf Grauert
aus Berlin

Berlin 1976



1. Gutachter : Prof. Dr. H. Fenner
2. Gutachter : Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung : 11. 2. 1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen
Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung
und unter Leitung von Prof. Dr. H. Fenner durch-
geführt.

Für die Überlassung des Themas und anregende
Diskussionen danke ich Herrn Prof. Fenner.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. P. Hemmerich,
Universität Konstanz Fachbereich Biologie, für
wertvolle Diskussionsbeiträge.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Theoretischer Teil	
1. Einleitung	1
1.1. Strukturelle Variationen des Flavinsystems	1
1.2. Redox-Eigenschaften des Flavins im Vergleich zu anderen Biokatalysatoren	5
1.3. 5-Deazaflavine	8
1.4. 5-Thiaflavine	10
2. Darstellung von Thiaflavinen	13
2.1. Synthesen von Diazaphenothiazinen	13
2.2. Synthesen von 10H-2,4-Dioxypyrimidobenzothiazinen	14
2.3. Synthese der 5-Thiaflavine	17
3. Charakterisierung von Thiaflavinen	25
3.1. IR-, NMR- und Massenspektren der Thiaflavine	25
3.2. Elektronenspektroskopische Charakterisierung der Thiaflavine	31
3.3. ESR-spektroskopische Untersuchungen der Thiaflavin- Radikal-Kationen	36
4. Reaktionen der reduzierten Stufe des Thiaflavins	41
4.1. Ergebnisse der Dihydroflavinchemie	41
4.2. Alkylierungen von Thiaflavinen	44
4.3. Sigmatrope Alkylverschiebung an Thiaflavinen	60

5. Die oxidierten Stufen des Thiaflavins	64
5.1. Ein-Elektronen-Oxidation des Thiaflavin-Systems .	64
5.1.1. Strukturen von Flavosemichinonen	64
5.1.2. Thiaflavin-Radikale	67
5.1.2.1. Radikal-Kationen	67
5.1.2.2. Neutralradikale	73
5.1.2.3. Ein-Elektronen-Oxidation von Alkyl-Thiaflavinen	78
5.2. Zwei-Elektronen-Oxidation des Thiaflavin-Systems .	80
5.3. Stabilität und Reaktivität der oxidierten Stufen	90
Zusammenfassung	92
Experimenteller Teil	95
1. Allgemeine Angaben	95
2. Darstellung von Dioxopyrimido[5,4-b] [1,4]benzothiazinen (Thiaflavinen)	96
3. Alkylierung der Thiaflavine <u>20c</u> und <u>20d</u>	107
4. Darstellung der oxidierten Thiaflavine	115
Literaturverzeichnis	119

1. Einleitung

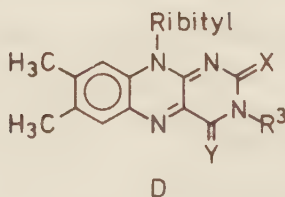
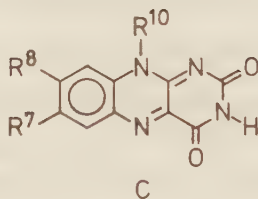
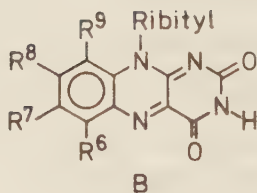
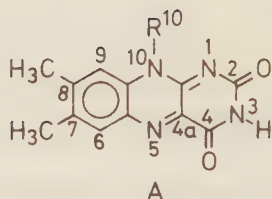
1.1. Strukturelle Variationen des Flavinsystems

Das ubiquitäre Vorkommen der Flavoproteine in biologischen Redox-Ketten - der tierischen Atmung ebenso wie der pflanzlichen Photosynthese und der mikrobiellen Oxigenierung - erklärt die besondere Stellung dieser Substanzklasse bei der Suche nach wirksamen Antimetaboliten.

Strukturelle Variationen der Flavine bezogen sich im wesentlichen auf folgende Positionen (Schema 1): A) Veränderung der N(10)-Ribityl-Seitenkette im Sinne einer Substitution durch Hydroxyalkylreste⁽¹⁾ bzw. Einführung basischer Seitenketten^(2,3). B) Ersatz der Positionen 6 bis 9 durch Homologe⁽⁴⁾ oder Heteroatome^(5,6). C) Modifikation der N(10)-Seitenkette einhergehend mit Substitution der 7- und 8-ständigen Methylgruppen^(7 - 12). D) Variation der 2- und 4-Position des Pyrimidin-Teilkerns durch Einführung ein- bis dreiwertiger Reste^(13,14).

Die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieser Flavin-Varianten sind in erster Linie auf deren veränderte Redox-Potentiale und Proteinbindungs-Eigenschaften zurückzuführen.

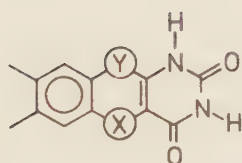
Abwandlungen am zentralen Pyrazin-Anteil waren ungeachtet seiner Bedeutung für die Redox-Aktivität des Tricyclus nur auf den Ribityl-Substituenten am N-10 beschränkt, so daß eine ausreichend spezifische Änderung der Redox - Eigenschaften in diesen Systemen nicht realisiert werden konnte.



Schema 1: Strukturelle Variationen des Flavinsystems

Demgegenüber ist bei einer Modifikation der Heteroatome in 5- bzw. 10-Position des Flavins im Vergleich zu den oben beschriebenen Varianten das für die Redox-Eigenschaften relevante Strukturelement in spezifischer Weise verändert. 5-Deazaflavine^(15, 16), in denen N-5 durch Kohlenstoff ersetzt ist, stellen derartig isoster substituierte Systeme dar. N(5)-Austausch durch Schwefel führt zu 5-Thiaflavinen, die weder in der

reduzierten Form noch in ihrer oxidierten Stufe bekannt waren, sondern nur als N(10)-unsubstituierte Derivate (5-Thialumichrome) untersucht sind^(17 - 19). Inzwischen sind auch 10-Deazaflavine hergestellt worden⁽²⁰⁾.



X = NH
Y = N-R
Dihydroflavin
H₂Fl_{red}

X = CH₂
Y = N-R
5-Deaza-Dihydroflavin
H₂dFl_{red}

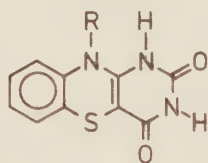
X = S
Y = N-R
5-Thia-Dihydroflavin
HsFl_{red}

X = NH
Y = CH₂
10-Deaza-Dihydroflavin -

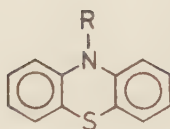
Die Hypothese eines Antimetabolitencharakters der 5-ständig modifizierten Flavine, vor allem der Thiaflavine, wird durch enzymatische Untersuchungen über die Wechselwirkung von Phenothiazinen mit Flavoproteinen (D-Aminosäuren-Oxidase) unterstützt, in denen eine kompetitive Verdrängung des Coenzyms (FAD) durch verschiedene Phenothiazine und andere tricyclische Psychopharmaka nachgewiesen wird^(21,22).

Im Gegensatz zu dem zugrunde liegenden Heterocyclus C, welcher ein

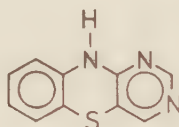
ausgesprochenes Elektronenmangelsystem darstellt, unterscheiden sich 5-Thiaflavine A aufgrund der Donator-Eigenschaften der 2,4-Dioxogruppen elektronisch und sterisch nicht wesentlich vom Phenothiazin B, wohl aber weisen beide Systeme unterschiedliche Polarität auf.



A



B



C

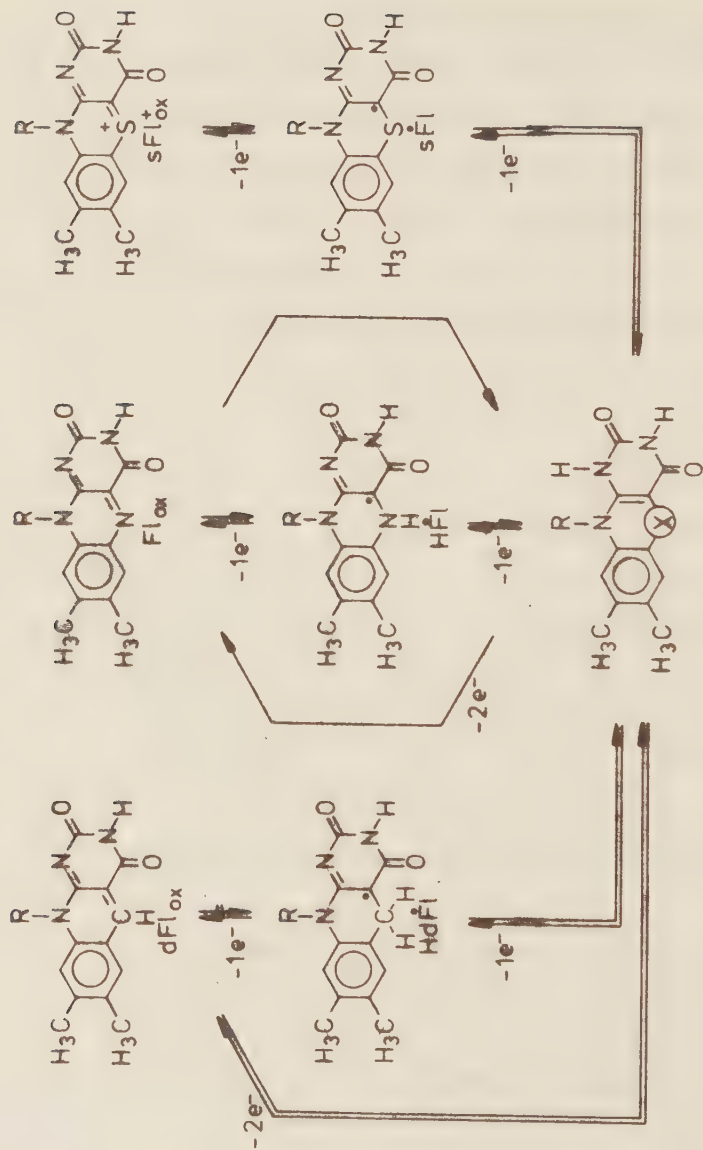
1.2. Redox-Eigenschaften des Flavins im Vergleich zu anderen Biokatalysatoren

Vom Flavin - Fl_{ox} - leiten sich durch Aufnahme je eines e^- und H^+ zwei weitere thermodynamisch stabile Redoxstufen $\text{H}\dot{\text{F}}\text{I}$ und $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ ab, deren Existenz über den gesamten biologisch relevanten pH-Bereich an nativen Coenzymen bewiesen werden konnte. Für jede dieser Redoxstufen des Flavins lassen sich analoge Strukturen der 5-Deazaflavine und 5-Thiaflavine formulieren (Schema 2).

Die in der vorliegenden Dissertation referierte Flavinchemie ist Gegenstand der folgenden Übersichtsreferate : Hemmerich, Veeger und Wood - 1965 ⁽²³⁾ , Penzer und Radda - 1967 ⁽²⁴⁾ , Lambooy - 1967 ⁽²⁵⁾ , Hemmerich, Nagelschneider und Veeger - 1970 ⁽²⁶⁾ , Neims und Helerman - 1970 ⁽²⁷⁾ , Berezovskii - 1972 ⁽²⁸⁾ , Rivlin - 1975 ⁽²⁹⁾ , Hemmerich - 1976 ⁽³⁰⁾ und Bruice - 1976 ⁽⁴⁷⁾.

In Anlehnung an die neuere Flavinliteratur werden folgende Abkürzungen verwendet :

Redoxstufe	Flavin	5-Deazaflavin	5-Thiaflavin
oxidiert	Fl_{ox}	dFl_{ox}	sFl_{ox}^+
Semichinon	$\text{H}\dot{\text{F}}\text{I}$	$\text{Hd}\dot{\text{F}}\text{I}$	$\text{s}\dot{\text{F}}\text{I}$
reduziert	$\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$	$\text{H}_2\text{dFl}_{\text{red}}$	HsFl_{red}



$\text{H}_2\text{dFl}_{\text{red}}, \text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}, \text{HsFl}_{\text{red}}$
 $\text{X} = \text{CH}_2 \quad \text{X} = \text{NH} \quad \text{X} = \text{S}$

Scheme 2: Redoxstufen der Flavine, Deazaflavine und Thiaflavine

Bis zum Anfang der sechziger Jahre galt die Aufmerksamkeit in der Flavinchemie vor allem der stabilen Flavochinonstufe. Erst Untersuchungen des reduzierten Flavins - $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ - auf spektrale Eigenschaften, Stereochemie, Nucleophilie, Tautomerstrukturen und Reaktivitäten einschließlich der Folgeprodukte der Photo-reduktion, sowie der Disproportionierungsgleichgewichte der Flavosemichinonstufe, ermöglichten es, die Vielseitigkeit der Flavinkatalyse zu erkennen.

Der wesentliche Unterschied zwischen Flavinen und aufgrund ihres Potentials vergleichbaren biologischen Redox-Systemen, wie Nicotinamid und Ubichinon, liegt in der Eigenart des Flavins, thermodynamisch reversibel Ein- und Zwei-Elektronen-Transfer zu bewerkstelligen. Dies beinhaltet sowohl die schrittweise Ein-Elektronen-Oxidoreduktion, wie sie biologisch ausschließlich im Ubichinon erfolgt, als auch den Nicotinamid-analogen Zwei-Elektronenschritt der Hydrid-Übertragung. Dieser Dualismus befähigt das Flavin als einzigen Redoxkatalysator, die Funktion einer Umschaltstelle zwischen Hydrid- und Elektronen-Transfer einzunehmen.

Dementsprechend wird vorgeschlagen ⁽³¹⁾, die bisher übliche Unterscheidung zwischen Dehydrogenasen, die durch die Bildung der blauen Radikale $5\text{-H}\dot{\text{F}}\text{I}$ charakterisiert sind, und den die roten Radikale $1\text{-H}\dot{\text{F}}\text{I}$ bildenden Oxidasen aufzugeben, zugunsten einer Differenzierung der verschiedenen Flavoproteine nach der Anzahl der nach "output" umgesetzten Elektronen :

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Reine e^- -Transferasen | - e^- -Transport ($Fe^{3+} \xrightarrow{e^-} Fe^{2+}$) |
| b) Dehydrogenase/ e^- -Transferasen | - $O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^-$ |
| c) Dehydrogenase/ Oxidasen | - $O_2 \xrightarrow{2e^-/2H^+} H_2O_2$ |
| d) Dehydrogenase/ Oxigenasen | - $O_2 \xrightarrow{4e^-/RH/2H^+} R-OH + H_2O$ |
| e) Reine Dehydrogenasen | - H^- -Transport ($NAD^+ \xrightarrow{H^-} NADH$) |

1.3. 5-Deazaflavine

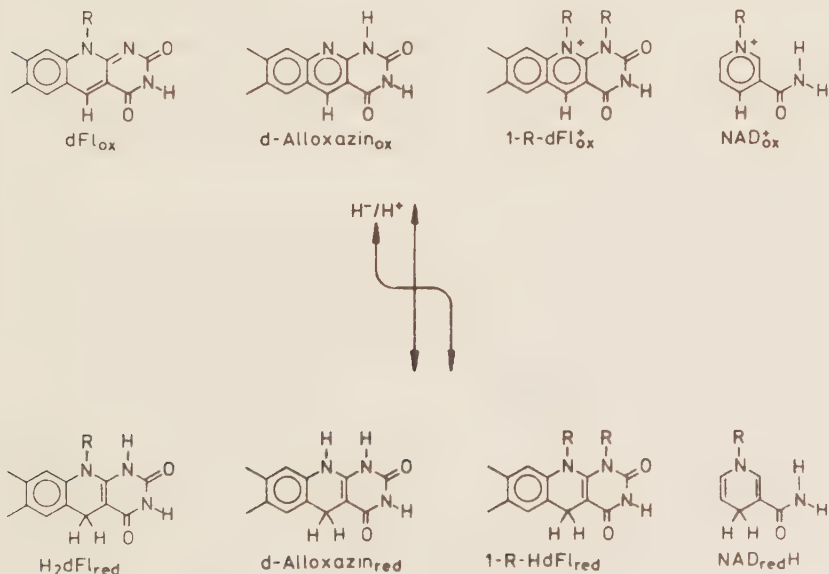
5-Deazaflavine - dFl_{ox} - und - H_2dFl_{red} - sind auf ihre spektralen Eigenschaften, Tautomerstrukturen, Reaktivität, Redoxverhalten und Photochemie sowohl als 5-Deaza-Alloxazine^(16,32), als auch 5-Deazaalloxazine^(15,19,32 - 39) im Vergleich zum Flavin untersucht worden.

Nach Einbau in Apoproteine zeigen 5-Deazaflavocoenzyme unterschiedliche (De)-hydrierungsaktivitäten. Mit Hilfe dieser Modellsysteme werden z. Zt. enzymatische Studien durchgeführt, um eine Unterscheidung der Reaktion verschiedener Substrate nach 2/1- bzw. 1/2-Elektronen-Transfer-Mechanismus zu ermöglichen^(36,40 - 45).

Deazaflavin-Radikale sind thermodynamisch instabil. Deren elektrochemische Bildung führt in polaren und apolaren Lösungsmitteln zur irreversiblen Dimerisierung⁽³⁹⁾, was auch in Abwesenheit von O_2 bei der Photoreduktion von dFl_{ox} gefunden wurde⁽³⁴⁾. Die Instabilität der Radikale zeigt sich auch bei polarographischen Messungen: Die Potentiale des $1e^-$ -Schrittes unterscheiden sich drastisch von denen der Flavine.

Dagegen werden für die $2e^-$ -Oxidoreduktion vergleichbare Werte ermittelt⁽³³⁾. Diese Ergebnisse zeigen, daß 5-Deazaflavine ausschließlich $2e^-$ -Transfer (und zwar nur nach dem 1/2-, nicht nach dem 2/1-Mechanismus) besitzen, also als Nicotinamidanaloga mit Flavin-Habitus anzusprechen sind.

Für den Vergleich der Strukturelemente der oxidierten Stufen dFl_{ox} , Fl_{ox} und NAD^+ ist Alkylsubstitution in 1- und 10-Position ausschlaggebend (Schema 3). Während 5-Deazaalloxazine⁽¹⁶⁾ und 1,10-disubstituierte Deazaalloxazine⁽³²⁾ auch in dieser Stufe Nicotinamid-Struktur besitzen, sind die 1-unsubstituierten-10-blockierten oxidierten Systeme dFl_{ox} Flavochinon-ähnlich.



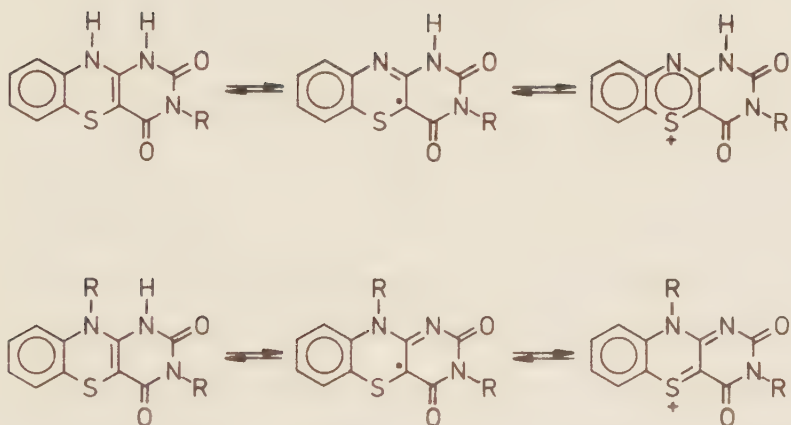
Schema 3: Vergleich oxidiert und reduzierter Stufen verschieden substituierter Deazaflavine mit NAD.

1.4. 5-Thiaflavine

5-Thiaalloxazine (Schema 4) sind bekannt und die Chemie dieser Systeme ist auf ihre Analogie zu Phenothiazinen und Flavinen hin untersucht worden (17 - 19,46). Sie stellen O_2 -stabile Dihydroderivate der Alloxazine dar, bilden aufgrund ihrer Benzothiazinstruktur Radikale und lassen sich durch $2e^-$ -Oxidation in isolierbare Thiazoniumkationen überführen. Sie unterscheiden sich also von den 5-Deazaflavinen durch die Stabilität ihrer Semichinonstufe.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, in 10-Stellung substituierte Dioxypyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazine - 5-Thiaflavine - herzustellen, welche wegen ihrer 1,5-Dihydrostruktur als Thiaisoalloxazine (Schema 4) anzusehen sind, Reaktivitäten der elektronenüberschüssigen reduzierten Stufe gegenüber elektrophilen Reagenzien zu untersuchen, Tautomerstrukturen spektral zu erfassen und die Eigenschaften der oxidierten Stufen dieses Systems zu ermitteln.

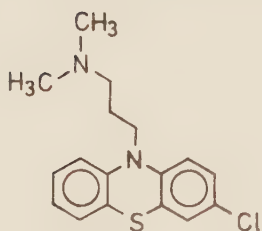
Auf diesem Wege sollte es möglich sein, die biochemische Relevanz, die nur Thiaflavinen, nicht jedoch Thia - Alloxazinen eigen sein kann, zu beurteilen, und Ähnlichkeiten und Unterschiede im Vergleich zu anderen Redox-Katalysatoren zu beschreiben.



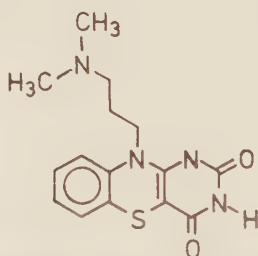
Schema 4: Redox-Stufen der Thiaalloxazine und Thiaflavine

Darüberhinaus sollte als Beitrag zum Beweis der Hypothese einer Flavin-Phenothiazin-Neuroleptica-Wechselwirkung⁽²²⁾ ein Thiaflavin mit einer ω -Dimethylaminopropyl-Seitenkette in 10-Position synthetisiert werden, welches eine Mittelstellung zwischen Flavin, Thiaflavin und Phenothiazin einnimmt. Mit Hilfe dieser Substanz wird durch enzymologische und

pharmakologische in vitro und in vivo Versuchen eine Überprüfung
der schon vorliegenden Untersuchungen ermöglicht.



Chlorpromazin

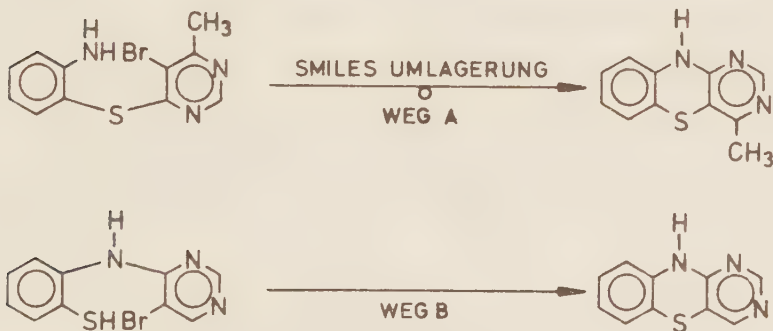


10- ω -Dimethylaminopropyl-
thiaflavin

2. Darstellung von Thiaflavinen

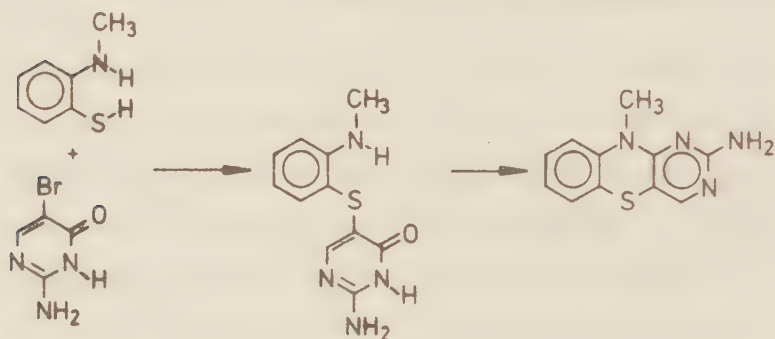
2.1. Synthesen von Diazaphenothiazinen

Pyrimidobenzothiazin ist 1961 erstmals synthetisiert und die im Pyrimidin-Teilkern variierten Derivate auf antiphlogistische und fungizide Aktivitäten untersucht worden ⁽⁴⁸⁾. Der Heterocyclus ist zugänglich aus geeigneten 2-Aminoaryl-6-pyrimidylsulfiden (Weg A) und 2-Mercaptoaryl-6-pyrimidylaminen (Weg B), wobei im Falle der Sulfide A unter den Reaktionsbedingungen (DMF, K_2CO_3 , Cu) Smiles-Umlagerung eintritt.



PHILLIPS ⁽⁴⁹⁾ stellte die strukturelle Ähnlichkeit des Heterocyclus als 1,3-Diazaphenothiazin zu psychotrop wirksamen Phenothiazinen heraus und erweiterte obige Synthese auf in 2- und 4-Stellung basisch substituierte Derivate. Der Mechanismus der sauer katalysiert durchgeführten Smiles-Umlagerung des Weges A wird diskutiert.

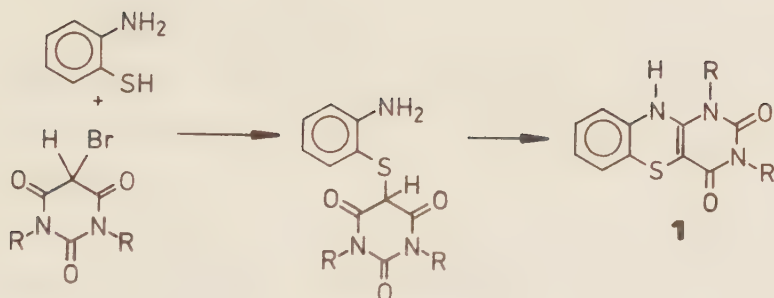
Neue Synthesen von 5-Arylthio-4-hydroxypyrimidinen^(50 - 52), deren Umsetzung zu 1,3-Diazaphenothiazinen⁽⁵³⁾, sowie die Kinetik der sauren Cyclisierung⁽⁵⁴⁾ wurden von ROTH et. al. untersucht.



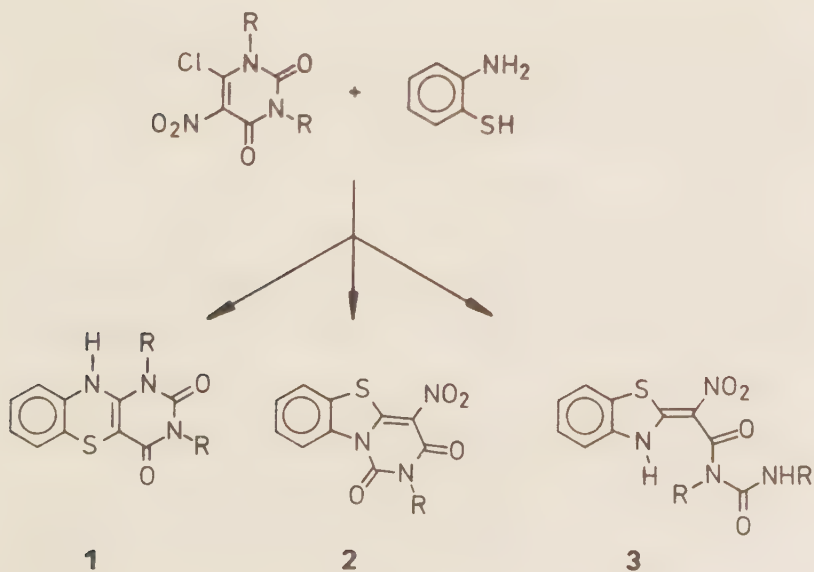
Der dabei entstehende Heterocyclus ist als erstes 10-ständig alkyliertes Derivat des Pyrimidobenzothiazins das dem Thiaflavin nächst bekannte System, welches aufgrund der cyclischen Resonanz, begünstigt durch den Donator-Substituenten in 2-Position, als Diazaphenothiazin anzusprechen ist.

2.2. Synthesen von 10-H-2,4-Dioxypyrimidobenzothiazinen

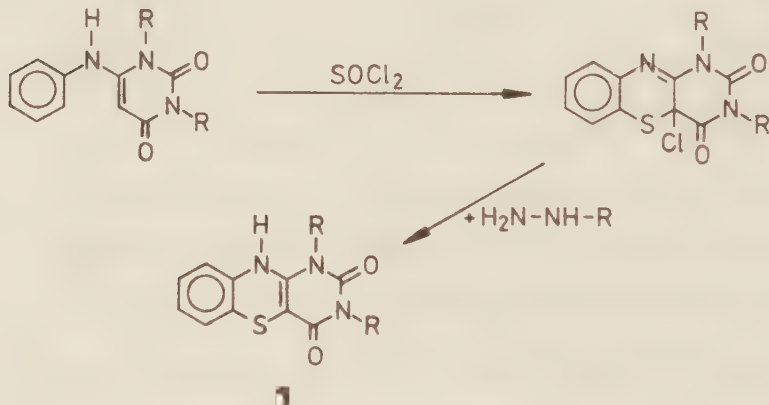
Im 2,4-Dioxypyrimidobenzothiazin 1 liegt dagegen ein dem Dihydroflavin analoges System vor, dessen Synthese nach NARANG⁽⁵⁵⁾ und FENNER⁽⁵⁶⁾ durch Cyclisierung der aus 5-Brombarbitursäuren und 2-Aminothiophenol zugänglichen Arylthiopyrimidinen gelingt.



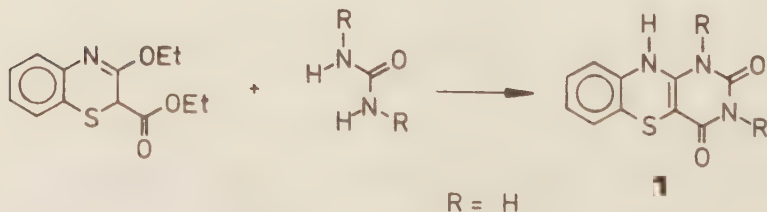
MAKI ⁽⁵⁷⁾ erweiterte obige Synthese durch Einführung von 5-Nitro-6-chloruracilderivaten als Pyrimidinkomponente zur Reaktion mit 2-Amino-thiophenol und erhielt abhängig vom Reaktionsmedium 1 (in Ggw. von Basen), 2 (in Eisessig) und 3 (in Benzol).



Eine neue Darstellungsmethode der 2,4-Dioxoverbindung 1 durch Kondensation von Anilinouracilderivaten mit Thionylchlorid und nachfolgender Reduktion der zunächst entstehenden 4a-Chlorverbindung ist von GOLDMAN (58) beschrieben worden.



GRANIK erhielt 1 ausgehend vom 3-Äthoxy-benzo(1,4)thiazin-2-carbonsäureäthylester durch Umsetzung mit Harnstoff (59).

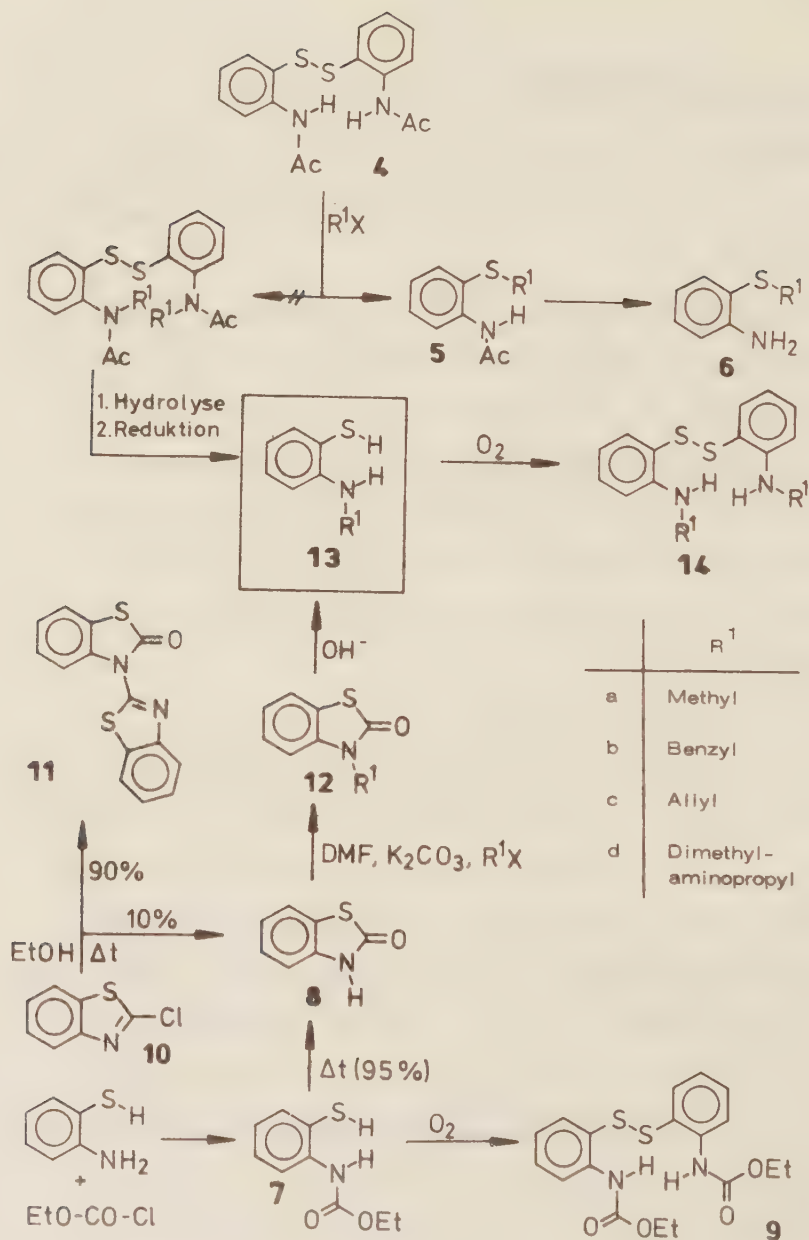


2.3. Synthese der 5-Thiaflavine

Hierzu sollte die Methode nach NARANG und FENNER - die Kondensation von 2-Aminothiophenol mit Barbitursäure - mit N-alkylierten Thiophenolen angewendet werden.

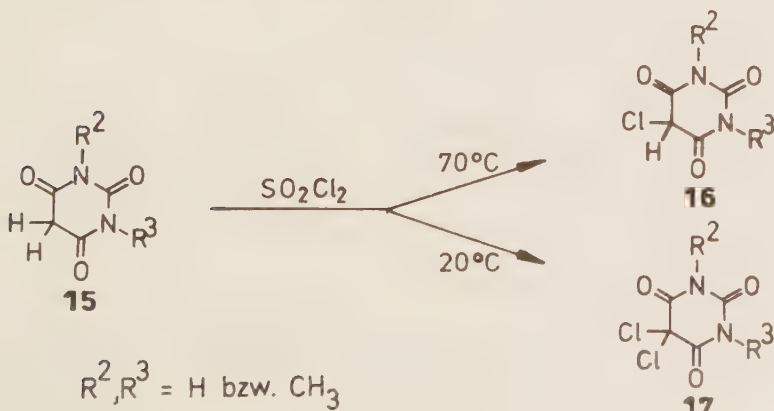
Die Reduktion von Disulfiden zu Thiophenolen ist schon mit schwachen Reduktionsmitteln leicht durchführbar, so daß die Disulfidbindung als Schutzgruppe der SH-Bindung angesehen werden kann. Monoalkylierung der Aminogruppe sollte durch vorherige Acylierung sichergestellt werden. Alkylierung der Disulfide 4 ergab jedoch in quantitativer Ausbeute unter Spaltung der Disulfidbindung N-Acylthioäther 5, so daß Disulfide als Ausgangsverbindungen bei der Alkylierungsreaktion ausgeschlossen werden mußten.

Als nützlichere Zwischenstufe erwies sich Benzothiazolin-2-on 8, das quantitativ zu 12 alkyliert und alkalisch zu den entsprechenden N-Alkylaminothiophenolen 13 hydrolysiert werden kann ^(60,61). 8 wurde unter Abwandlung der Synthese nach CLAASZ ⁽⁶²⁾ durch Reaktion von 2-Aminothiophenol mit Chlorameisensäureester (anstelle von Phosgen) erhalten. Hierbei erfolgt zunächst Angriff des Säurechlorids am Stickstoff unter Bildung des Urethans 7, welches sich in einer thermodynamisch gesteuerten Reaktion langsam durch weiteres (48 stdg.) Erhitzen zu 8 umsetzt. Eine weitere Synthesemöglichkeit für 8 ist nach HOFMANN die Reaktion von 2-Chlorbenzothiazol 10 mit Äthanol, welche aber entgegen der Literaturangabe ⁽⁶³⁾ in ca. 90 %iger Ausbeute das Dimere 11 liefert.

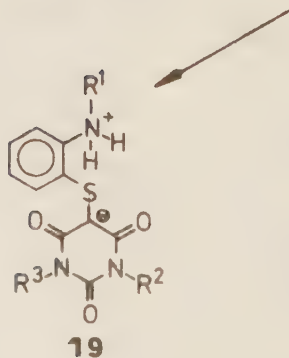
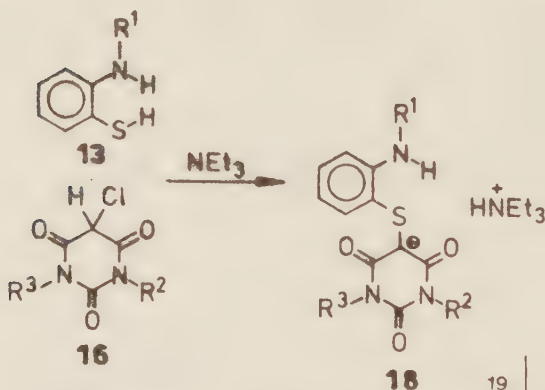


7 und 13 sind als Thiophenole oxidationsempfindlich und ergeben in Gegenwart von O_2 9 bzw. 14. Daher wurden die N-Alkylaminothiophenole 13 ohne weitere Reinigung mit Barbitursäurederivaten umgesetzt.

Als Pyrimidinkomponente erwies sich 5-Brombarbitursäure als weniger geeignet, da durch Redox-Reaktionen Disulfide 14 und 5-unsubstituierte Barbitursäuren 15 Hauptprodukte der Reaktion waren, und zudem die Synthese der 5-Brombarbitursäure Schwierigkeiten bereitet. Dagegen erwies sich 5-Chlorbarbitursäure als besserer Reaktionspartner, für die eine einfache Synthese gefunden werden konnte und deren Reaktion mit Thiophenolen in guten Ausbeuten verläuft. Eine allgemeine Darstellungsmethode ist die Chlorierung von Barbitursäuren 15 mit Sulfurylchlorid in Wasser bei $70^\circ C$, bei der ausschließlich die 5-Monochlorprodukte 16 entstehen. Im Gegensatz dazu werden bei Raumtemperatur quantitativ 5,5-Dichlorbarbitursäuren 17 gebildet.



Bei der Reaktion von 16 mit den Thiophenolen 13 entstehen in Gegenwart von Triäthylamin Arylthiopyrimidine, 18 gut kristallisieren und als solche aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in apolaren Lösungsmitteln NMR-spektroskopisch charakterisiert werden können. Durch Säuren lassen sich die Verbindungen 19 aus wässriger Lösung ausfällen. 19h entsteht durch Reaktion von 5-Chlorbarbitursäure und -Dimethylaminopropyl-2-aminothiophenol in DMF ohne Hilfsbase. Die Produkte 19 wurden entweder durch Vergleich mit bekannten Daten oder durch ihre spektroskopischen Eigenschaften und Elementaranalysen identifiziert.



19	R ¹	R ²	R ³
a	H	H	H
b	H	CH ₃	CH ₃
c	CH ₃	H	H
d	CH ₃	H	CH ₃
e	CH ₃	CH ₃	CH ₃
f	Benzyl	H	CH ₃
g	Allyl	H	CH ₃
h	Dimethyl - aminopropyl	H	H

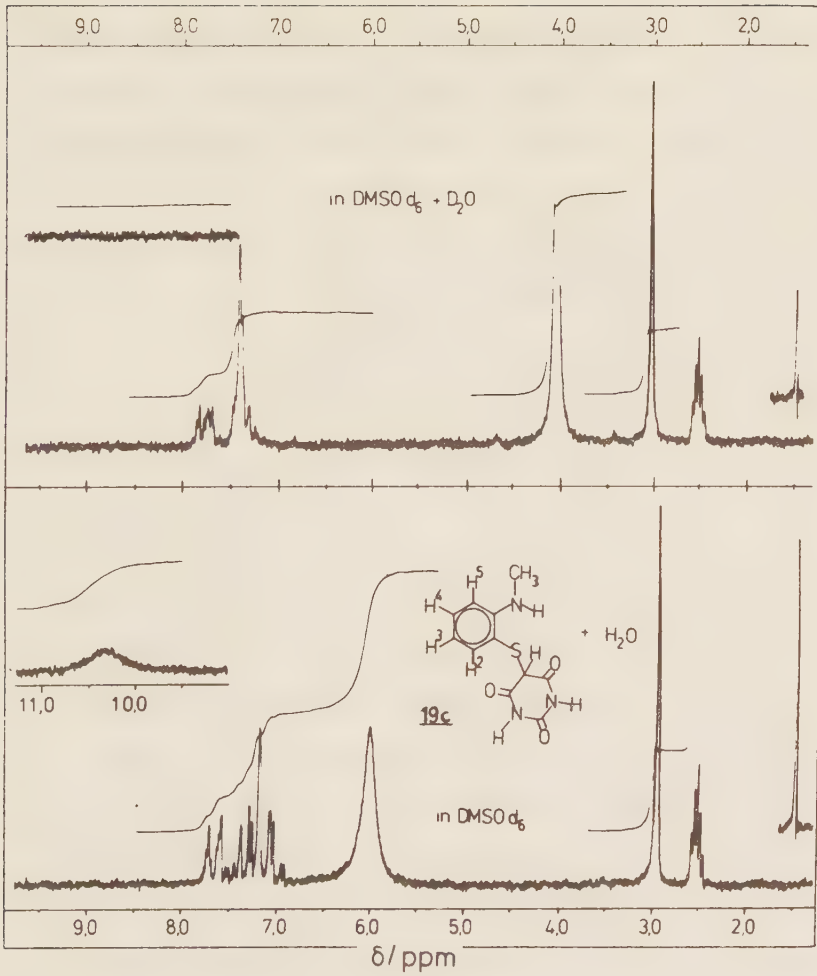
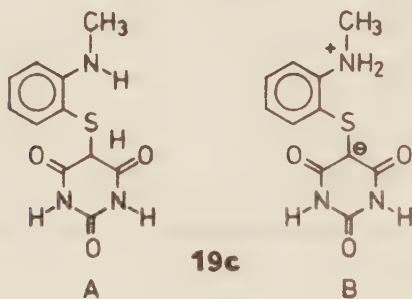


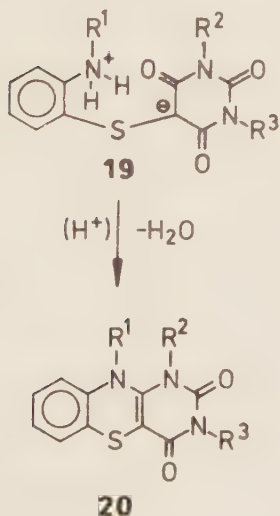
Abb. 1: ^1H -NMR-Spektren von **19c**.

In Abb. 1 sind die NMR-Spektren von 19c in DMSO und DMSO/D₂O abgebildet. Die starke Verschiebung der aromatischen Protonen 3 bis 5 nach D₂O-Austausch ergibt sich aus der Veränderung des Milieus; Im basischen DMSO liegt 19a-g in der Struktur A vor. Nach Zugabe von D₂O bildet sich



die zwitterionische Struktur B, was auch mit der Verschiebung der Protonen 3,4 und 5 zu tiefem Feld in Einklang steht. Die chemische Verschiebung des Protons 2 bleibt weitgehend unbeeinflusst und ist abzuleiten aus der Anisotropie mit der 4- bzw. 6-CO Gruppe des Pyrimidin-Kerns. Weiter wird dieser Lösungsmittelleffekt durch Aufnahme von 19 in Pyridin und von 18 in Chloroform bestätigt, in denen Struktur A vorliegt und die Protonen 3 bis 5 entsprechende chemische Verschiebungen aufweisen. In sauren Lösungsmitteln, wie Trifluoressigsäure erhält man dagegen ein dem Tautomer B analoges Aromatenmultipllett. 19 kristallisiert mit einem Molekül H₂O, das gemeinsam mit dem Amin-NH und Pyrimidin-CH ein in D₂O austauschbares 4-Protonen-Singulett bei 6,0 ppm ergibt.

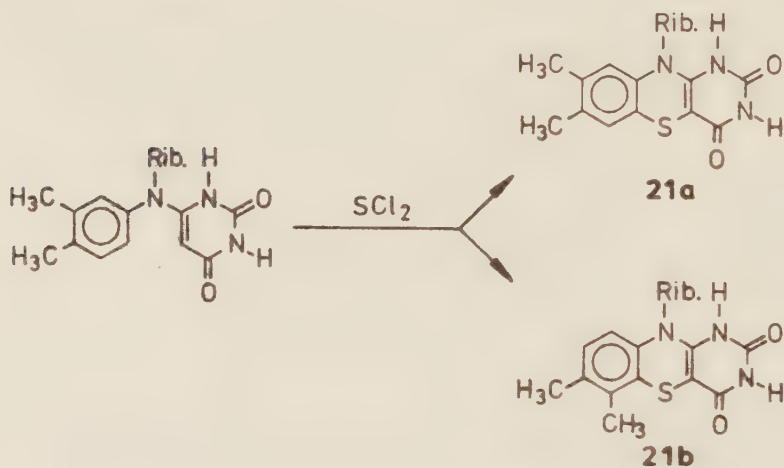
Cyclisierung zu in 1-Position unsubstituierten Dioxypyrimidobenzothiazinen verlaufen unter den von ROTH untersuchten Bedingungen - 0,6 n Äthanol. HCl / 70°C - nahezu quantitativ. Die Produkte 20 fallen in 65 - 85 %iger Ausbeute aus der Reaktionslösung aus. Die Synthese der 1,3,10-Trimethylverbindung 20e führt im System Äthanol/HCl nur zu Spaltprodukten wie Bis(N-methyl-2-aminophenyl)disulfid, N,N-Dimethylbarbitursäure und 5,5'-Bis(N,N-dimethylbarbitursäure). Durch 24 stündiges Erhitzen einer 1 %igen Lösung von 19e in Xylol in Gegenwart katalytischer Mengen p-Toluolsulfonsäure erhält man in 10 %iger Ausbeute 20e .



20	R ¹	R ²	R ³
a	H	H	H
b	H	CH ₃	CH ₃
c	CH ₃	H	H
d	CH ₃	H	CH ₃
e	CH ₃	CH ₃	CH ₃
f	Benzyl	H	CH ₃
g	Allyl	H	CH ₃
h	Dimethyl - aminopropyl	H	H

Nachdem so der Grundtyp HsFl_{red} (20c) erhalten wurde, konnte HEMMERICH die dem natürlichen Flavin entsprechenden 7,8-Dimethyl-10-ribityl-derivate 21

auf direktem, jedoch nicht eindeutigem Weg durch Kondensation von Amino-
uracilderivaten mit SCl_2 erhalten und durch spektroskopischen Vergleich
mit dem Grundtyp 20c charakterisieren^(33,64).



3. Charakterisierung von Thiaflavinen

Die Struktur der Thiaflavine wurde mit Hilfe der IR-, NMR- und massenspektroskopischen Daten gesichert. Elektronenspektroskopische Daten liefern zusätzlich Hinweise auf deren Elektronenverteilung, Acidität, Basizität und sind nützliche Parameter für den Vergleich mit Flavinen und anderen isoster substituierten Systemen. Die stabilen Radikal-Kationen der Thiaflavine wurden ESR-spektroskopisch charakterisiert.

3.1. IR-, NMR- und Massenspektren der Thiaflavine

Für den Grundtyp - HsFl_{red} - 20c ist, wie an N(10)-unsubstituierten Verbindungen 20a,b bewiesen⁽⁴⁶⁾, eine 1,3-H-Struktur zu erwarten, deren Identifizierung nur IR-spektroskopisch erfolgen kann.

Sie wird belegt durch die beiden Carbonylschwingungen bei 1680 und 1630 cm^{-1} , welche sich bei N-Alkylierung (Verbindung 20e) nur unwesentlich verschieben (Abb. 2, Tabelle 1).

An Dihydroflavinen konnte durch Vergleich ihrer IR-Spektren mit N,N-, O,N- bzw. O,O-Dialkylderivaten die 2,4-Diketostuktur gesichert werden^(65,66). Ebenso bestätigt der IR- und UV-spektroskopische Vergleich mit weiter unten abgehandelten Alkylthiaflavinen das Vorliegen der 1,3-H-Struktur des unsubstituierten Thiaflavins 20c. Bei C- und O-Alkylierung verändern sich die Carbonylabsorptionen drastisch, bzw. verschwinden im Falle der O,O-Disubstitution.

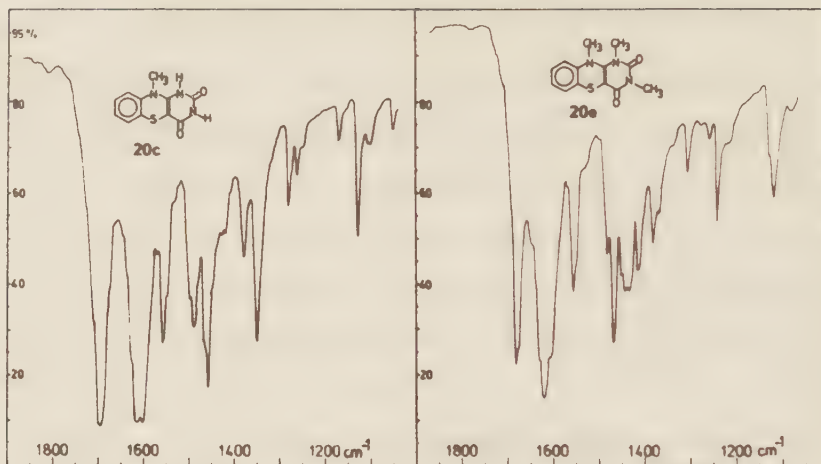


Abb. 2: IR-Spektren (KBr) von 20c und 20e .

Die NMR- und IR-Daten aller totalsynthetisch dargestellten Thiaflavine 20 gehen aus Tabelle 1 hervor.

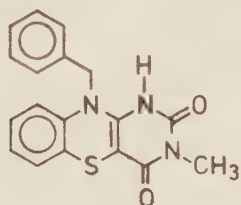
Protonen in Position 1 und 3 erscheinen z.T. als stark verbreiterte Signale und sind über den Bereich von 11,5 - 10,0 ppm als Integral zu erfassen. Das Singulett bei 8,3 bzw. 8,6 ppm fehlt bei N(10)-Alkylderivaten 20c-h und ist dem N(10)-H der Verbindungen 20a,b zuzuordnen.

Die Unterscheidung der chemischen Verschiebung der 3- und 10-Methylgruppen ist durch Vergleich der Spektren der 3-Methyl-10-benzyl-Verbindung 20f und dem 3-Benzyl-10-methyl-Derivat 28 möglich.

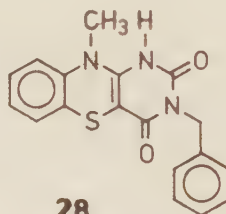
Tabelle 1:

20	R ¹	R ²	R ³	¹ H - NMR	IR-Absorptionen [cm ⁻¹]		
				DMSO d ₆ δ [ppm]:	νNH	ν2-CO	ν4-CO
a	H	H	H	10,9-10,25 (s 2H; 1 und 3) 8,3 (s 1H; 10) 7,2-6,5 (m 3H; 6,7,8 und 9)	3345	1620	1685
b	H	CH ₃	CH ₃	8,65 (s 1H; 10) 7,0-6,8 (m 4H; 6,7,8 und 9) 3,3 (s 3H; N-1 CH ₃) 3,1 (s 3H; N-3 CH ₃)	3400	1620	1680
c	CH ₃	H	H	11,2-10,7 (s 2H; 1,3) 7,45-6,75 (m 3H; 6,7,8 und 9) 3,30 (s 3H; 10-CH ₃)	3450	1630	1695
d	CH ₃	H	CH ₃	11,58-10,95 (s 1H; 1) 7,4-6,8 (m 4H; 6,7,8 und 9) 3,36 (s 3H; 10-CH ₃) 3,18 (s 3H; 3-CH ₃)	3450	1635	1675
e	CH ₃	CH ₃	CH ₃	7,30-7,05 (m 4H; 6,7,8 und 9) 3,18 u. 3,25 (ss, 6H; 3 u. 1 CH ₃) 3,39 (s 3H; 10-CH ₃)	-	1620	1683
f	BZ	H	CH ₃	11,7-10,8 (s 1H; N-1) 7,7-6,7 (m 9H; arom. H) 5,16 (s 2H; N-10-CH ₂ -) 3,14 (s 3H; 10-CH ₃)	3465	1630	1685
g	Allyl	H	CH ₃	11,5-10,5 (1H, N-1) 7,25-6,8 (cm, 4H; 6,7,8 und 9) 6,1-5,1 (m, 3H, vinyl) 4,65-4,45 (dd2H; N-10-CH ₂) 3,15 (s, 3H, N-3)	3475	1630	1685
h	DMAP	H	H	11,5-10,3 (2H; 1,3) 7,7-6,7 (4H; 6,7,8 und 9) 3,3 (m, 2H; N-10 CH ₂) 2,8 [cm, 8H; -CH ₂ -N(CH ₃) ₂] 2,1 (m, C-CH ₂ -C)	3420	1630	1695

Hieraus ergibt sich, daß die N(3)-Methylgruppe bei höherem Feld (3,10 - 3,18 ppm) erscheint, als die N(10)-Methylprotonen (3,30 - 3,36 ppm).



20f



28

Die N(1)-Methylgruppe der Verbindung 20e hat eine chemische Verschiebung von 3,25 ppm (Abb. 3).

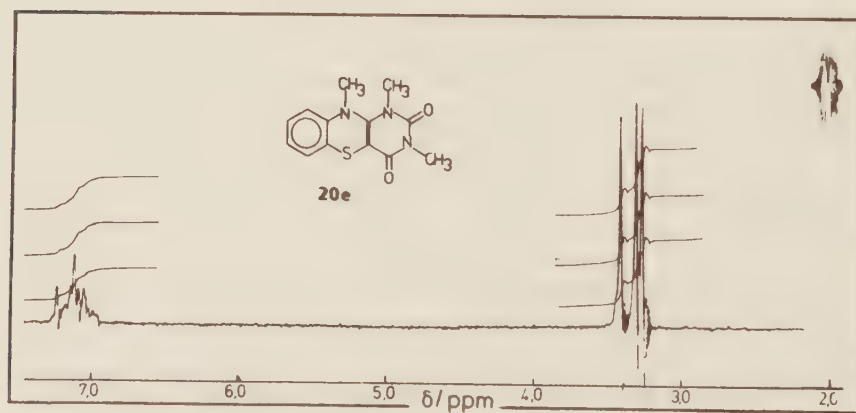


Abb. 3: NMR-Spektrum von 20e in CDCl_3 (100 MHz).

Die Benzylmethylengruppe in 10-Stellung weist ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 5,16 ppm auf, 10-Allylmethylenprotonen erscheinen bei 4,55 ppm und spalten zu Doppelduplett auf mit einer Kopplungskonstanten von 6 Hz für die vicinale und 2 Hz für die allylische Kopplung.

Bei N(10)- ω -Dimethylaminoalkyl-Substitution von 20h tritt das Singulett für die beiden N-Methylgruppen gemeinsam mit einem angespaltenem Triplett der N(3')-Methylengruppe bei 2,8 ppm auf. Die N(10)- und 2'-Methylenprotonen absorbieren als 2-Protonen-Multipletts bei 3,3 und 2,1 ppm. Eine eindeutige Interpretation der Kernresonanzspektren von 20h gelingt nicht, da es als Salz vorliegt und infolge intramolekularer ionischer Fixierung der Seitenkette am Tricyclus zur Inäquivalenz der Propyl-Protonen führt.

Der unterschiedliche massenspektroskopische Abbau des Thiaalloxazins 20b und Thiaisoalloxazins 20d geht aus Abb. 4 und Schema 5 hervor:

In beiden Fällen findet man Elimination von Methylisocyanat (m/e 204) mit anschließender Abspaltung von CO (m/e 176). Bildung des Ions m/e 228 welches durch Abspaltung von SH^+ entsteht, findet man nur in der Thiaalloxazin-Reihe (20b). Eine weitere Unterscheidung der Isomeren durch die Fragmentierung ist die bevorzugte Elimination aus der 10-Position, bei der im Falle von 20b ein Wasserstoff m/e 260 und 20d eine Methylgruppe m/e 246 abgespalten wird.

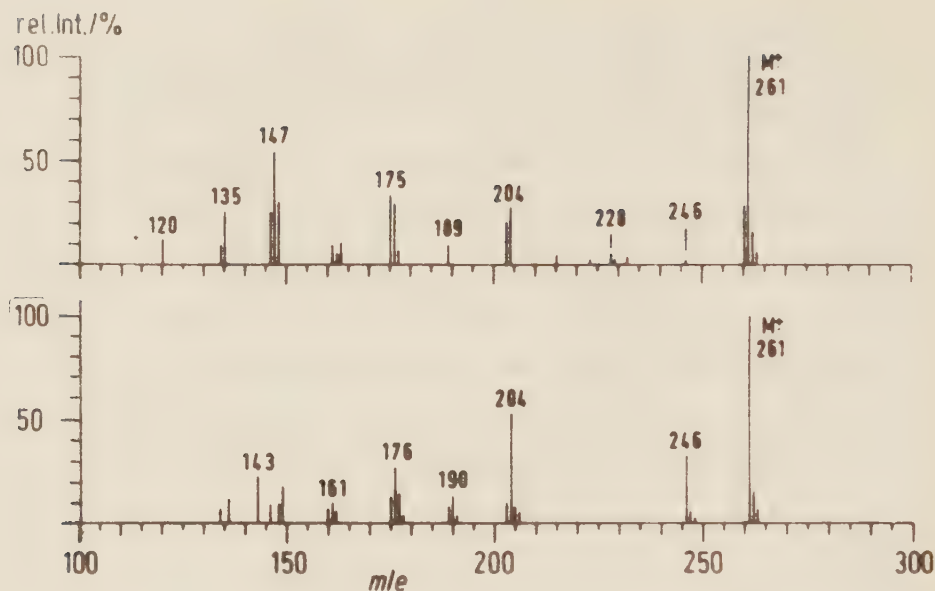
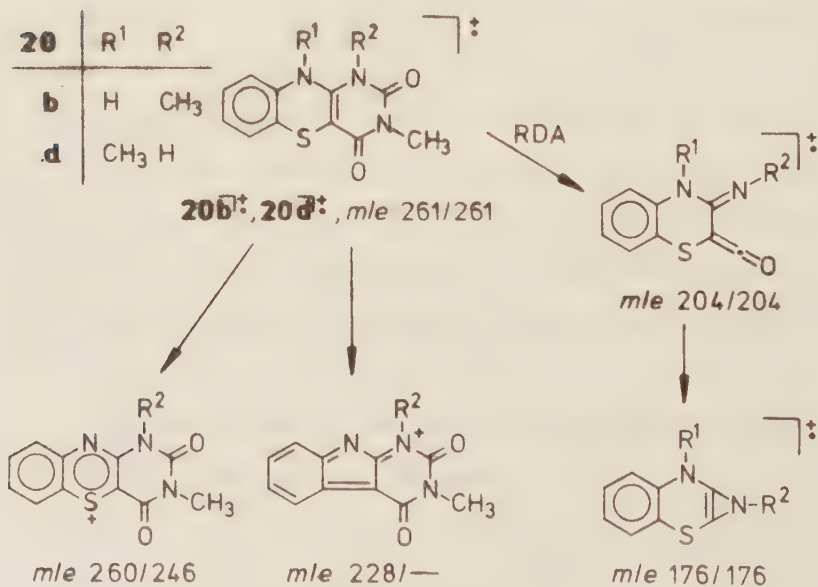


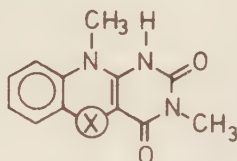
Abb. 4: Massenspektren von 20b (oben) und 20d (unten).



Schema 5: Fragmentierung von 20b und 20d.

3.2. Elektronenspektroskopische Charakterisierung der Thiaflavine

In Abb. 5 sind die UV-Spektren der Neutralkörper und Anionen der Dihydroflavine, Dihydrodeazaflavine und Thiaflavine verglichen.



X= NH DIHYDROFLAVIN

X= CH₂ DIHYDRODEAZAFLAVIN

X= S THIAFLAVIN

Diese Systeme unterscheiden sich in erster Näherung nicht in ihrer σ -Struktur, sondern vor allem in ihrer mehr oder minder großen Nonplanarität, die sich aus den Eigenschaften des im zentralen Ring lokalisierten 8π -Systems bei konjugationsfähigem Zentrum X ableiten.

Ein Maß für die Planarität der Dihydroflavine ist die langwellige Endabsorption, die durch Ansteigen der Extinktion von 450 - 350 nm im Elektronenspektrum charakterisiert ist. Zu erklären ist diese unspezifische Absorption durch das FRANCK-CONDON-Verbot des ersten Übergangs ⁽⁶⁶⁾.

Im Grundzustand ist das Flavohydrochinon, wie auch die anderen isoster substituiereten Abkömmlinge, gewinkelt, im ersten elektronischen Anregungszustand hingegen planar, so daß mit ansteigender Planarität des Grundzustandes die Übergangswahrscheinlichkeit und damit ϵ bei 400 nm steigt.

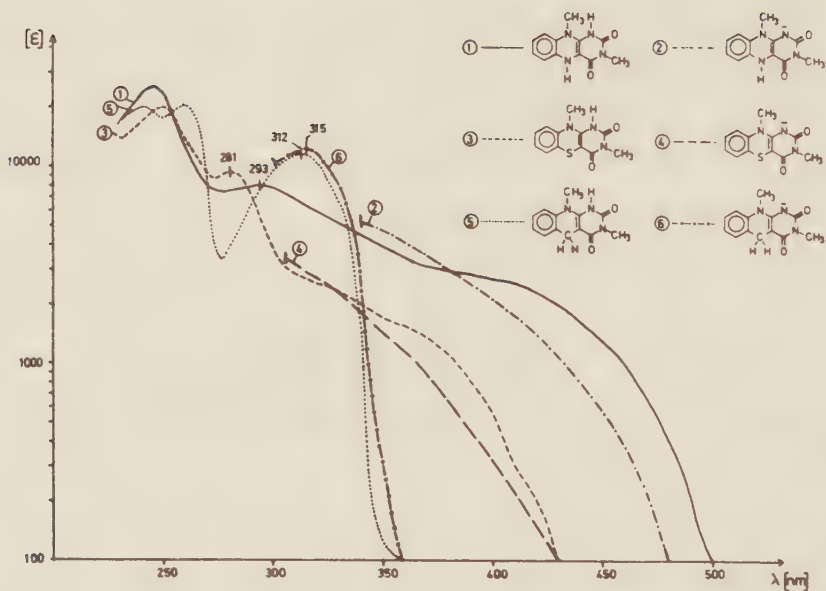
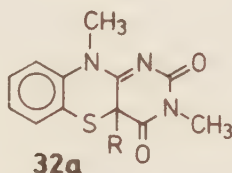


Abb. 5: Elektronenspektren der Neutralkörper und Anionen der Dihydroflavine⁽⁶⁷⁾, Dihydrodeazaflavine und Thiaflavine.

D.h. je gewinkelter das tricyclische System ist, desto mehr sp^3 -Charakter haben die Heteroatome 5 und 10 und desto geringer ist ihre Resonanzfähigkeit. Die relativ intensive Endabsorption der Dihydroflavine mit $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im Vergleich zum Thialumichrom (ca. 1000), Thiaflavin (ca. 500) und Deazadihydroflavin (0) zeigt die abnehmende Beteiligung der nichtbindenden Elektronen an der tricyclischen Resonanz und die damit verbundene Nonplanarität dieser Systeme. Im Fall des Deazadihydroflavins

handelt es sich mit der $-CH_2-$ -Gruppe in 5-Stellung um ein nicht mesomeriefähiges Zentrum mit vollständigem sp^3 -Charakter.

Aus dem Vergleich der Elektronenspektren der Neutralkörper $HsFl_{red}$ und $4a-RsFl_{red}$ (32a, Abb. 6) ergibt sich, ebenso wie aus den IR-Spektren, daß eine 4a,5-Dihydrostruktur (32a, $R=H$) für das Thiaflavin auszuschließen ist. Damit in Einklang steht, daß die NMR-Spektren keine sp^3 -CH Absorption aufweisen.



Eine solche Struktur muß wegen der bei den Dihydroflavinen, Thialumichromen und - wie sich herausstellt - Thiaflavinen auftretenden nucleophilen Reaktivität des C(4a)-Brückenkopfes in Betracht gezogen werden.

N(1)-Deprotonierung mit einem pK von 6 bewirkt bei Thiaflavinen wie bei Dihydroflavinen einen deutlichen Rückgang der langwelligen Endabsorption aufgrund weiterer Verminderung der Resonanz zwischen S-5 und dem Pyrimidin-Teilkern. Dementsprechend reflektiert Deprotonierung die Absorption >350 nm bei Flavinen und Thiaflavinen, während der Chromophor des 5-Deazadihydroflavins nur wenig beeinflusst wird. Die Acidität des N(1)-Protons des Thiaflavins mit $pK=5,8$ ist verglichen mit 5-Alkyldihydroflavinen ($pK=7,2^{(68)}$) größer, infolge Einbeziehung der resonanzfähigen d-Orbitals des S-5.

In HCl konz. oder Trifluoressigsäure erscheint die langwellige Bande aller HsFl_{red} bei 370 nm ($\epsilon = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Der elektronenspektroskopische Vergleich mit den unten beschriebenen 4a-Alkylderivaten in Trifluoressigsäure zeigt weitgehende Analogie der Chromophore der Kationen, während die entsprechenden Neutralkörper deutlich voneinander unterschieden sind (Abb. 6). Hieraus ergibt sich C(4a)-Protonierung für das Thiaflavin.

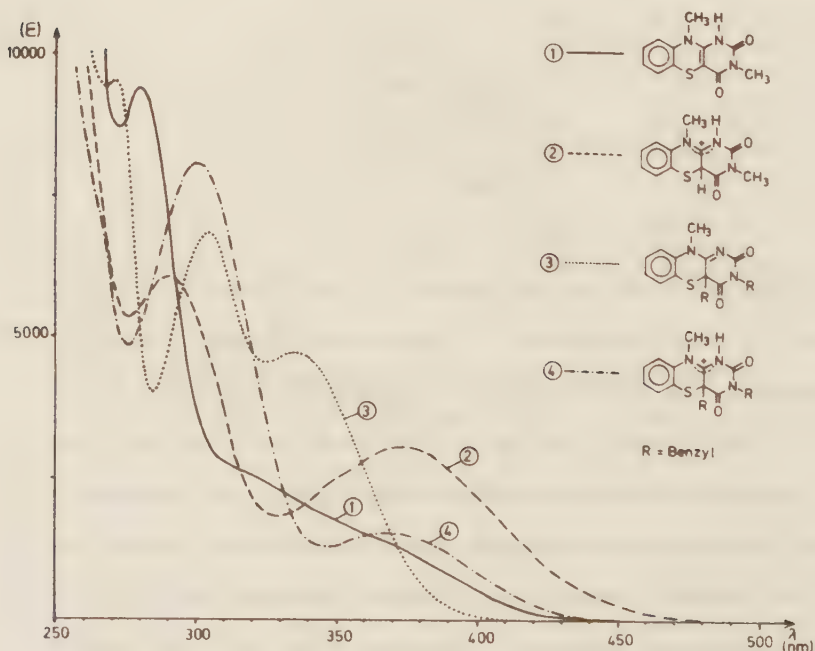


Abb. 6: Elektronenspektren der Neutralkörper in CH_3OH und Kationen in Trifluoressigsäure von 20d und 32b.

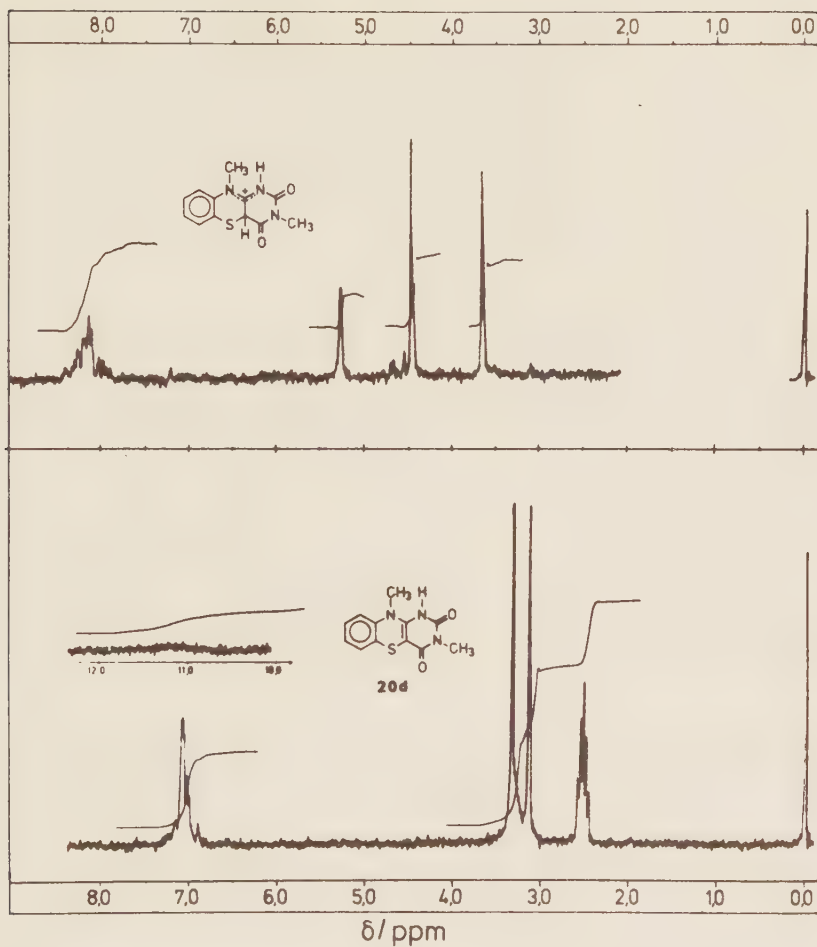
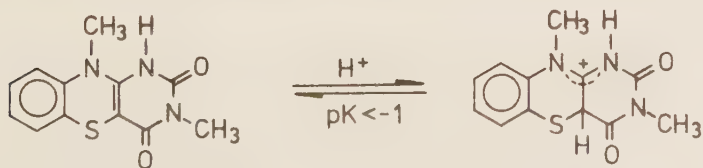


Abb. 7: NMR-Spektrum von **20d** in DMSO(d_6) und Trifluoressigsäure



Die Aufnahme eines NMR-Spektrums der protonierten Spezies gelingt durch Lösen von 20d in Trifluoressigsäure, dem zur Verhinderung der Radikalbildung Zink-Pulver zugegeben wird. Das C(4a)-Proton erscheint bei 5,2 ppm. Die N(10)-Methylgruppe der Amindin-Kation-Struktur ist um 1,2 ppm nach tiefem Feld verschoben (bei 4,5 ppm). Die Beeinflussung der N(3)-Methylgruppe ist erwartungsgemäß kleiner (0,6 ppm), sie absorbiert bei 3,7 ppm. Bei Ersatz der Trifluoressigsäure durch Deuterio-trifluoressigsäure erscheint das C(4a)-H-Singulett nicht, während die Methylprotonen die chemischen Verschiebungen des Kations aufweisen. Der Elektronen-spektroskopische Vergleich der Kationspektren in Trifluoressigsäure und Trifluoressigsäure in Gegenwart von Zink-Pulver zeigt innerhalb der Meßzeit des NMR-Spektrums keine reduktiven Veränderungen von 20d.

3.3. ESR-spektroskopische Untersuchungen der Thiaflavin-Radikal-Kationen

Durch Oxidation von HsFl_{red} mit Dibenzoylperoxid entstehen in saurer Lösung stabile Radikal-Kationen, welche die ESR-Spektren der Abbildungen 8 - 11 ergeben.

Die Linienzahl und Linienbreite ist nur abhängig von der N(10)-Substitution, nicht von Substituenten an N(1) und N(3). So ergibt die 1,3,10H-Verbindung 20a im ESR-Spektrum 4 Linien mit einer ungefähren Intensitätsverteilung 1:2:2:1 mit der Kopplung $a_{\text{N}} \approx a_{\text{NH}} = 4,0 \text{ G}$. Ein nahezu identisches ESR-Spektrum zeigt die 1,3-Dimethylverbindung 20b (Abb. 8),

woraus sich eine Spindelokalisation ausschließlich im Thiazinring mit einer Polarisierung zum N(10)-H ergibt. H/D-Austausch (Ersatz von Trifluoressigsäure durch Deuterotrifluoressigsäure) führt zur Aufhebung der N-H Kopplung und damit zu einem 3-Linienspektrum ($a_N = 4,0$ G).

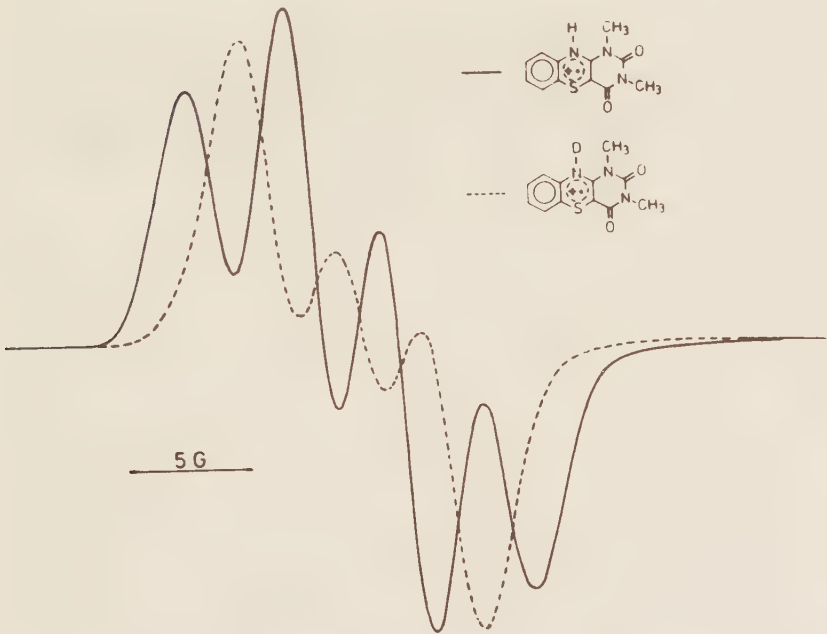


Abb. 8: ESR-Spektren von 36 in Trifluoressigsäure und Deuterotrifluoressigsäure.

Methylsubstitution in 10-Stellung bringt den danach zu erwartenden Hyperkonjugationseffekt. Wegen der Äquivalenz der 10-Methylprotonen und der der Stickstoffaufspaltung ähnlichen Kopplung der Wasserstoffe mit dem

Spinsystem erhält man ein 6-Linienspektrum mit der Intensitätsverteilung 1:4:7:7:4:1 ($a_N \approx a_{CH} = 4,5 \text{ G}$) (Abb. 9). Da im Falle der 1,3-H-10-Methylverbindung 20c bei Deuterierung die Linienzahl nicht verändert wird, ist auch hier Spindelokalisation in den Pyrimidin-Teilkern in erster Näherung auszuschließen.

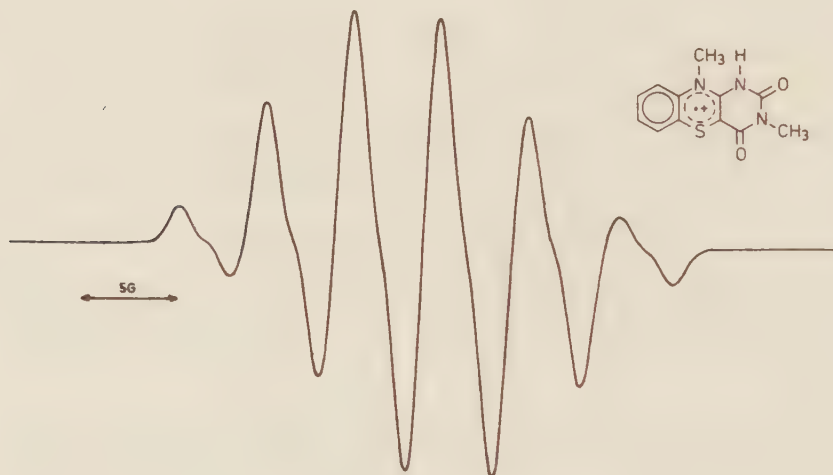


Abb. 9: ESR-Spektrum von 35 in Trifluoressigsäure

Variationen der Oxidationsbedingungen bezüglich Lösungsmittel, Oxidationsmittel und veränderten Aufnahmebedingungen erlauben es, ESR-Spektren mit Hyperfeinstruktur zu erhalten (Abb. 10), aus denen anhand der Kopplungskonstanten geringe Spindelokalisation in den benzoiden Teilkern und (eine noch geringere) Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Pyrimidin-Ringsystem

abzuleiten ist. Eine genaue Simulation der Spektren durch Computerberechnungen, aus denen allein die exakte Spinverteilung ablesbar sein wird, ist Gegenstand weiterer Arbeiten (69).

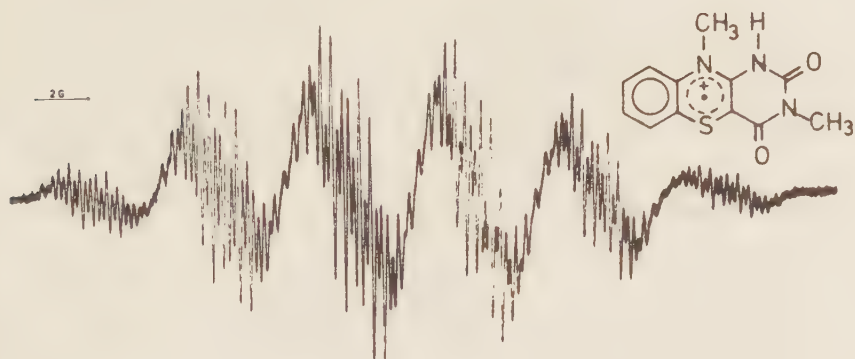


Abb. 10: Hyperfeinstruktur-ESR-Spektrum von 35

Die N(10)-Benzylverbindung 20f ergibt ein 8-Linienspektrum mit einer Intensitätsverteilung von 1:1:2:2:2:2:1:1 (Abb. 11). Der unterschiedliche Abstand der Linien von 2,0 und 2,3 G ist erklärbar durch die magnetische Inäquivalenz der Benzylmethylenwasserstoffe, deren Folge eine unterschiedliche Kopplung mit dem Spinsystem des Thiazinringes ist. Ein H weist eine ähnliche Kopplungskonstante wie der Stickstoff mit 4,7 G auf, während das zweite Methylen-H mit $a_{\text{CH}} = 2,0 \text{ G}$ mit dem Spinsystem koppelt.

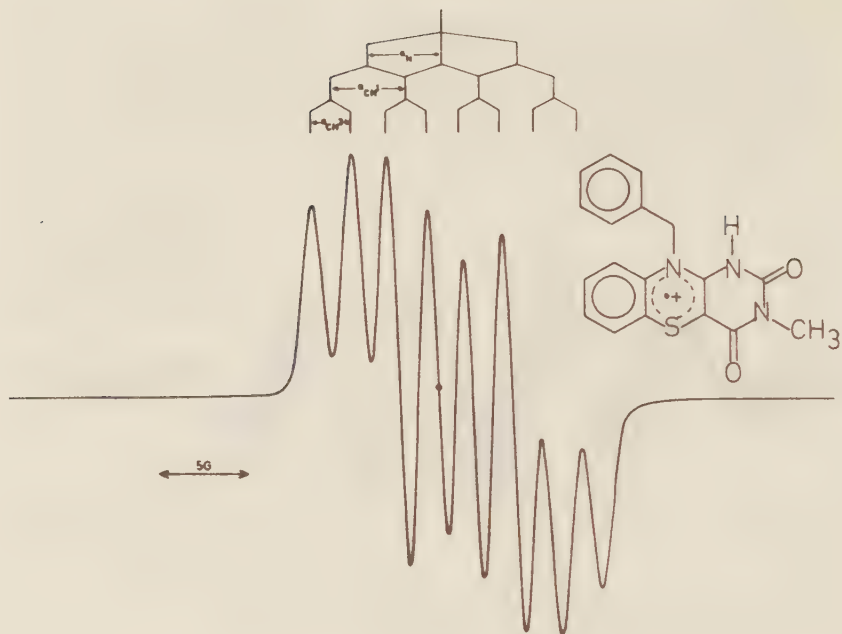


Abb. 11: ESR-Spektrum des Radikalkations von 20f in Trifluor-
essigsäure mit Kopplungsmuster

4. Reaktionen der reduzierten Stufe des Thiaflavins

4.1. Ergebnisse der Dihydroflavinchemie

Die besondere Bedeutung der reduzierten Stufe des Flavins wird dadurch verständlich, daß $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ an jeder Flavoprotein-katalysierten Redox-Reaktion beteiligt ist, während Fl_{ox} bzw. HFl je nach Art der Reaktion (Elektronen-, Hydrid-Transfer oder O_2 -Aktivierung) fehlen können.

Da es sich im Falle von $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ um ein 8 π -Elektronenüberschußsystem handelt, ist vor allem die Reaktivität gegenüber Elektrophilen interessant und in Bezug auf Verschiedenheit von Substraten und Reaktionsmilieu aufgeklärt worden ^(70 - 75). Neben der chemischen Bedeutung des Heterocyclus und der sich daraus ergebenden Untersuchungen der Chemie dieses Systems, ist die Synthese von verschiedenen substituierten Alkylderivaten des Dihydroflavins biologisch relevant, da in den Alkylprodukten Tautomerstrukturen (4a,5- , 2a,5- und 4a,5) der Dihydroflavine fixiert sind, deren unsubstituierte prototrope Formen keine thermodynamische Stabilität besitzen. Es wird aber diskutiert ⁽⁷⁶⁾, daß nach Einbau des Coenzym in das Apoprotein das Flavin in "aktivierter Form" vorliegt und als solches in der Lage ist, oben genannte Tautomerstrukturen einzunehmen. So wird von WEBER ⁽⁷⁷⁾ und YAGI ⁽⁷⁸⁾ eine Fixierung des FMN im Alten Gelben Ferment über den Phosphatrest und eine 3-Imino-4-hydroxy-Struktur beschrieben.

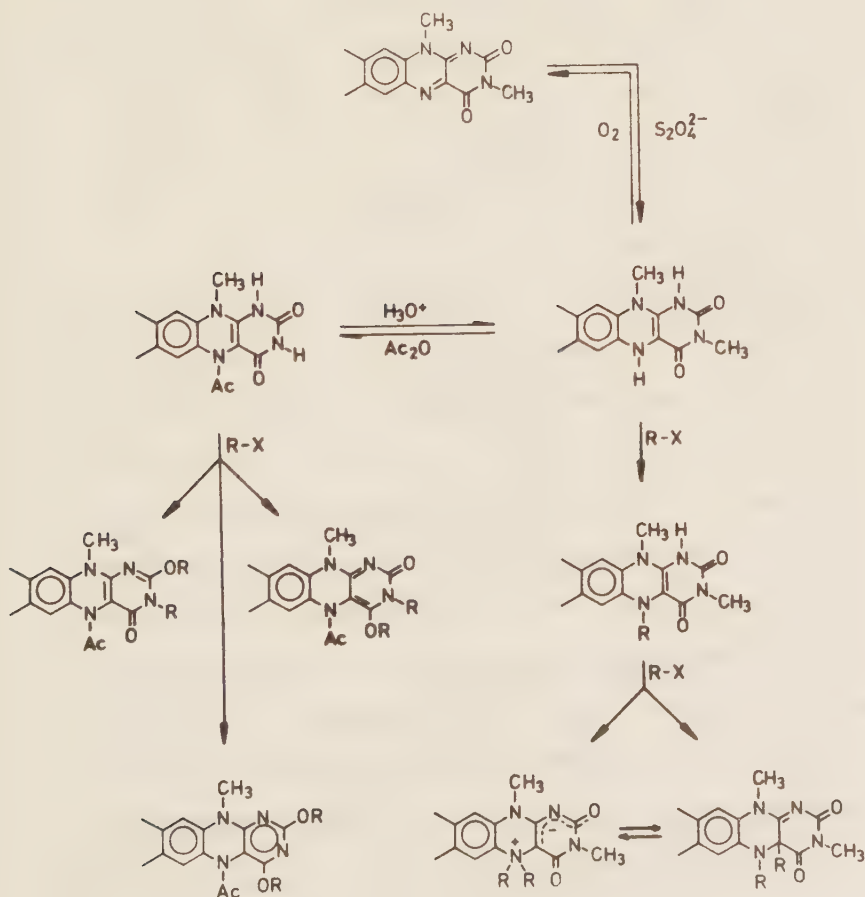
Bei Annahme kovalenter Zwischenstufen, in welchen das Substrat an das Flavin gebunden wird, können Alkyldihydroflavine als "Flavin-Substrat-Komplexe nullter Näherung" ⁽⁷⁵⁾ betrachtet werden. Sie verkörpern demnach thermodynamisch stabile Modellsubstanzen, die mit den z. T. sehr kurzlebigen Intermediaten biochemischer Reaktionen spektral vergleichbar sind und erleichtern somit die Identifizierung der Bindung an das Flavin. Die extreme O_2 -Empfindlichkeit der Dihydroflavine ist durch Acetylierung in 5-Stellung zu unterdrücken, die aber Planarität und Elektronenverteilung des tricyclischen Systems verändert. Bei der Alkylierung der 5-Acetyldihydroflavine wird lediglich ladungskontrollierter Angriff an den 2a,3- und 2a,4a-Positionen gefunden, während die Stellungen 1 und 4a sterisch gehindert sind.

Die reduktive Flavinalkylierung, bei der Fl_{ox} erst im Reaktionsmilieu zu H_2Fl_{red} reduziert und in situ basenkatalysiert elektrophil substituiert wird, ist die zweite Möglichkeit, zu Alkyldihydroflavinen zu gelangen ^(72,73).

Das Reduktionsmittel Dithionit erlaubt eine relativ große Variationsbreite dieser Methode in Bezug auf Reagenz und Milieu. Hierbei werden Grenzorbitalkontrolliert N(5)-Derivate gebildet, welche bei Reagenzüberschuß weiterreagieren zu 5,4a- bzw. 5,5-Dialkylverbindungen. O-Alkylderivate entstehen unter diesen Bedingungen nicht.

Der Modellcharakter der Alkyldihydroflavine wird unterstrichen durch die Mobilität der Alkylreste zwischen der 5- und 4a-Position, die z. T. in sehr kurzer Zeit pH-abhängig sigmatrop umlagern ^(75,79). Dadurch wird

der Zusammenhang zwischen den durch R^- -Angriff am C-4a des Fl_{ox} entstehenden 4aR-4a,5-Dihydroderivaten und den durch Reaktion von R^+ mit H_2Fl_{red} ebenso leicht entstehenden 5R-1,5H Fl_{red} innerhalb der Flavin-katalyse verständlich.



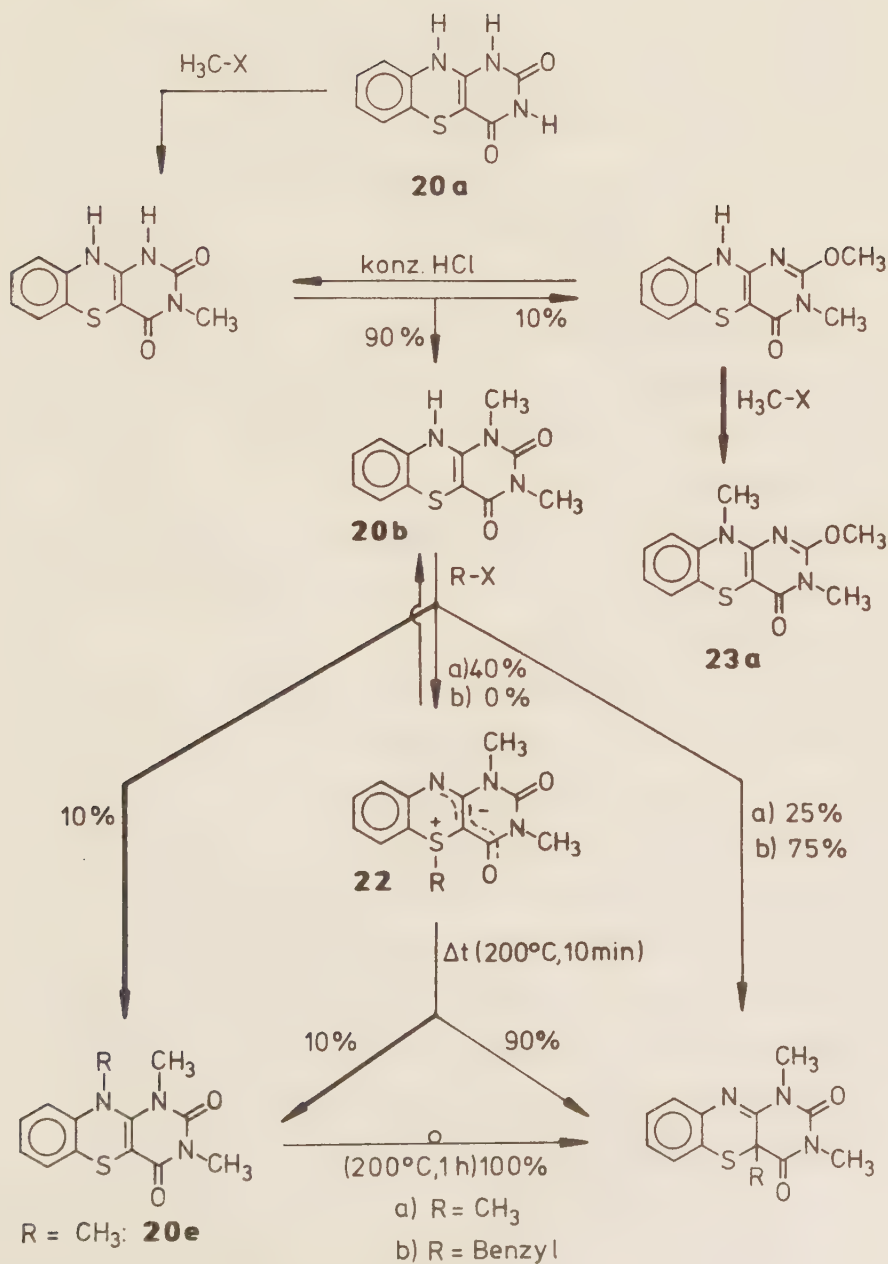
4.2. Alkylierungen von Thiaflavinen

Thiaflavine sind in ihrer reduzierten Stufe O_2 -stabil, so daß unter Alkylierungsbedingungen nicht mit Reoxidationsreaktionen - wie bei Dihydroflavinen - gerechnet werden muß.

In Anlehnung an die reduktive Flavinalkylierung ^(72 - 75) werden die Thiaflavine aprotisch basenkatalysiert alkyliert. Dabei ließen sich unter milden Bedingungen (Chloroform/ Diisopropylaminoäthan bei Raumtemperatur) N,S-Dialkylderivate als Primärprodukte fassen, während bei Behandlung mit Dimethylformamid/ K_2CO_3 bei 60 °C vorwiegend C,N- , O,N- respektive O,O-Dialkylprodukte erhalten wurden.

Im Folgenden wird unterschieden: Die Alkylierung 10-unsubstituierter Systeme (Thiaalloxazine) ^(46,80) generell von derjenigen 10-substituierter Systeme (Thiaisoalloxazine bzw. Thiaflavine im eigentlichen Sinne) - Formelschemata 6 - 8. Diese Unterteilung ist dadurch gerechtfertigt, daß Alkylierungen an N-10 allgemein nur in geringfügigem Ausmaß gefunden werden: Solche mit maximal 10 %iger Ausbeute verlaufenden Umsetzungen sind in Formelschema 6 hervorgehoben. Sie fallen jedoch präparativ nicht ins Gewicht. Der 10-ständige Substituent muß daher allgemein durch die Direktsynthese eingeführt werden - wie auch in der Flavinreihe notwendig ^(72,73).

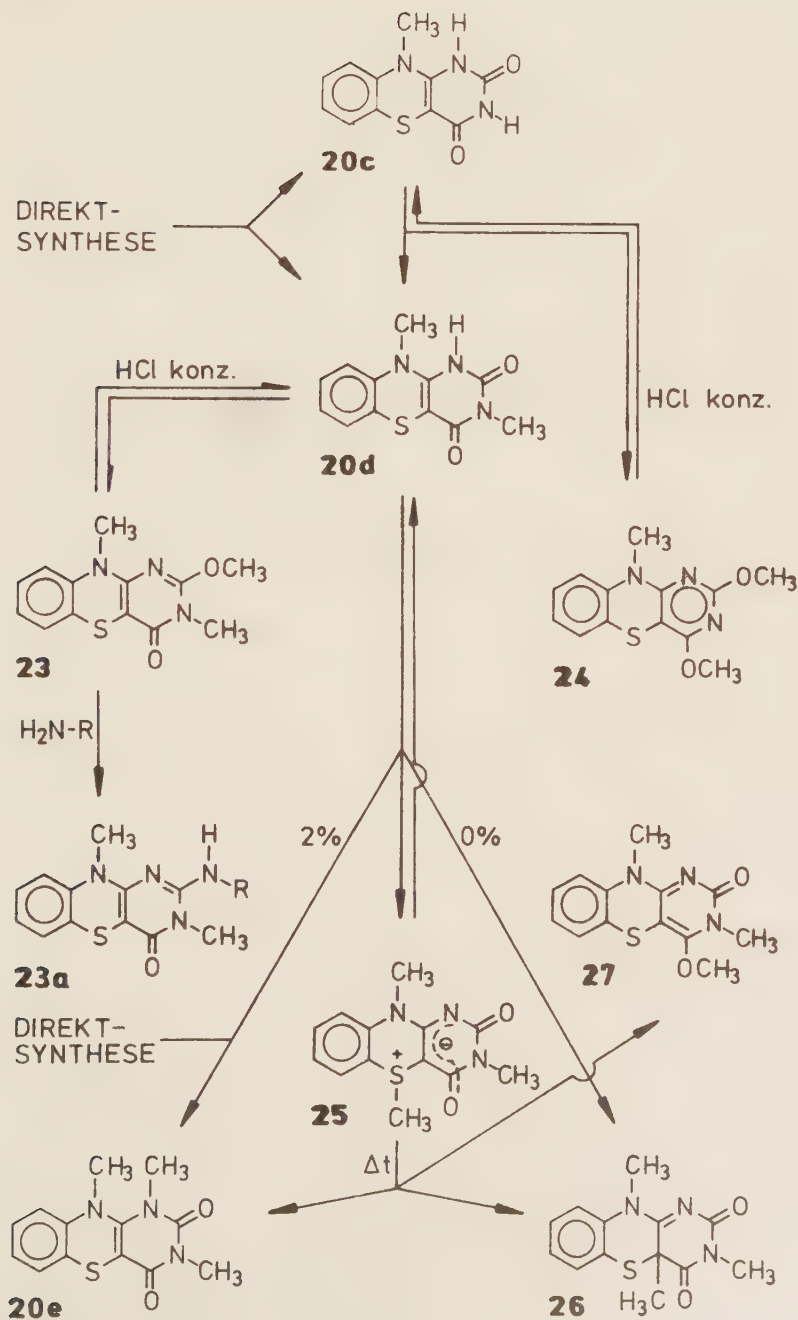
Als Substituenten wurden Methyl- und Benzylreste verwendet, wobei die beweglicheren Benzylreste das Studium von S-C und S-O Alkylwanderungen erlaubten (Formelschema 8).



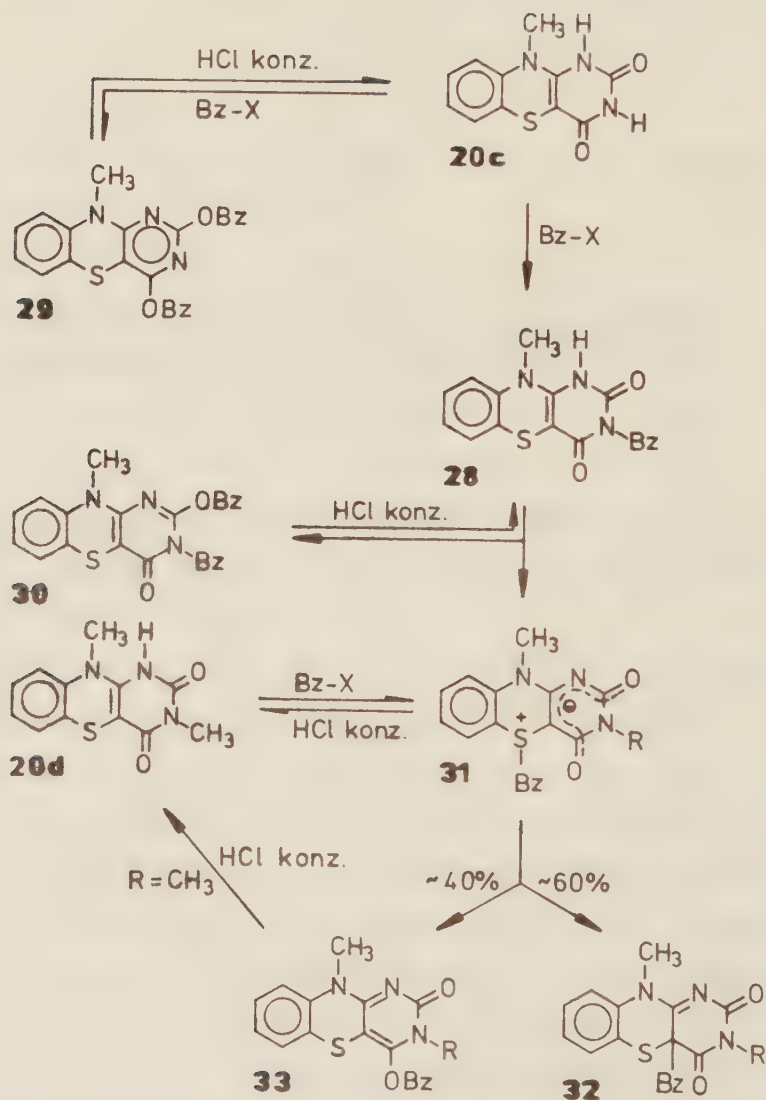
Bei der Strukturzuordnung wurde davon ausgegangen, daß ein elektrophiler Angriff im Prinzip an N(1,3), O(2a,4a) ladungskontrolliert und an C(4a) und S(5) grenzorbitalkontrolliert möglich ist. Reaktion erfolgt an allen oben genannten Positionen und ist durch Variation der Bedingungen nach Milieu und Alkylierungsmittel steuerbar.

Bei der Methylierung der 3,10-Dimethylverbindung 20d wird eine Abhängigkeit der Produktverteilung vom verwendeten Milieu und Methylierungsmittel - Dimethylsulfat bzw. Methyljodid - gefunden: Während als Hauptprodukt die O(2a)-Methylverbindung 23 anfällt, wird bei Einsatz von Methyljodid daneben auch wenig (ca. 2%) N(1)-Methylderivat 20e gebildet. In Chloroform/Diisopropylaminoäthan entsteht dagegen ausschließlich das S(5)-Methylprodukt 25. Methylierung von 20c ergibt neben 23 zu ca. 35 % die O(2a),O(4a)-Dimethylverbindung 24.

Die Benzylieung von 20c in Dimethylformamid/ K_2CO_3 mit Benzylchlorid als Reagenz erfordert eine Reaktionstemperatur von 60 °C. Es bilden sich langsam (innerhalb von 5 h) ausschließlich 2a,3-, 2a,4a- und 3,4a-Dibenzylderivate 30, 29 und 32b. Alkylierung der am N-3 vormethylierten Verbindung 20d mit Benzylbromid bei Zimmertemperatur liefert nach kurzer Zeit die 4a- und S(5)-Substitutionsprodukte 32a und 31a, während bei einer Reaktionsdauer von 24 h außer dem 4a- nur noch das 4a-Benzylderivat 33 entsteht. Veränderung des Reaktionsmilieus in Richtung geringerer Polarität (Chloroform) unter Beibehaltung von Benzylbromid als Alkylierungsmittel, steuert den Angriff des Benzylrestes ausschließlich an S-5.



Formelschema 8



a) R = CH₃

b) R = Benzyl (Bz)

Trennung und Isolierung der Trialkyl derivate ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität und Azido-Basizität möglich: S(5)-Alkylderivate sind als Zwitterionen polare Verbindungen, die sich leicht in Wasser, aber auch in Chloroform lösen und so von den anderen relativ unpolaren, wasserunlöslichen Verbindungen abgetrennt werden können. Aus alkoholischer Lösung bilden sich mit HClO_4 (70 %) Perchlorate, welche aus der Lösung analysenrein ausfallen. 2a,3- und 4a,3-Substitutionsprodukte sind in der Kälte schlecht in Alkohol löslich, so daß ihre Trennung von anderen gleichzeitig entstehenden Trialkylderivaten durch Umkristallisation aus Methanol gelingt. Die 1,3,10-Trimethylverbindung 20e ist durch Kristallisation nur schlecht von dem zugleich entstehenden 2a,3-Alkyl-Hauptprodukt 23 abzutrennen. Eine saubere Isolierung war nur mit Hilfe der Präparativen Dickschicht-Chromatographie im System Petroläther/Äther (8:2) möglich. 3,4a,10- und 2a,4a,10-Trialkylprodukte können aus Petroläther bzw. Äther rein kristallisiert werden.

Die Identifizierung der verschiedenen Alkylprodukte erfolgte unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte:

1. Im NMR-Spektrum läßt sich eindeutig eine C-4a von einer S-, N- bzw. O-Substitution unterscheiden. Während C(4a)-Methylgruppen wegen ihrer Nachbarschaft zu sp^3 -Kohlenstoffatomen Singulett im Bereich zwischen 1 und 2 ppm aufweisen, liegt die chemische Verschiebung von S-Methylgruppen bei 2,7 ppm, N-Methylprotonen zwischen 3,0 und 3,7 ppm und die der O-Methylgruppen um 4 ppm. O-, N-Benzylreste erscheinen als Singulett

bei 5,0 - 5,5 ppm, während C(4a)- und S(5)-Benzylmethylenprotonen AB-Systeme bei 3,0 und 3,3 ($J=14$ Hz) für C-4a und 4,0 und 4,2 ppm ($J=12$ Hz) für S-5 wegen der Nachbarschaft zu den chiralen Zentren 4a und 5 - liefern. Im Falle der 3,4a-Dibenzylverbindung 32b sind auch die N(3)-Methylenprotonen inäquivalent und geben ebenfalls ein AB-System mit gleicher Kopplungskonstante aber weniger unterschiedlicher chemischer Verschiebung beider Protonen (Abb. 12, Tabelle 2).

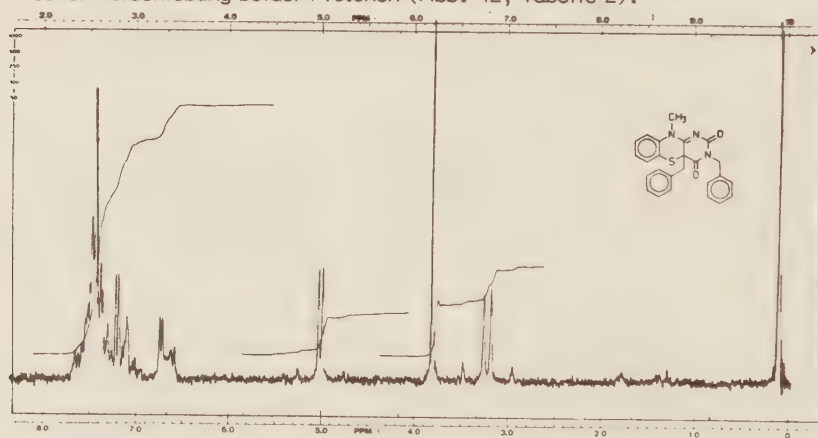


Abb. 12: ^1H -NMR-Spektrum von 32b in CDCl_3

2. N(10)-Substituenten bestimmen, wie oben gezeigt wurde, nach Oxidation in saurer Lösung zu Radikal-Kationen, die ESR-Spektren stark, so daß aus der Linienzahl und der H/D-Austauschbarkeit Alkylierung bzw. Desalkylierung in 10-Stellung direkt ableitbar ist. Da bei der Alkylierung im allgemeinen von 10-substituierten Verbindungen ausgegangen wird, findet die ESR-Spektroskopie hier keine Anwendung bei der Strukturaufklärung der Alkylthiaflavine. Da gegen sind bei Alkylierung von N(10)-H-

Derivaten ESR-spektroskopische Daten entsprechender Radikal-Kationen sicherste Parameter einer erfolgen Substitution in 10-Position.

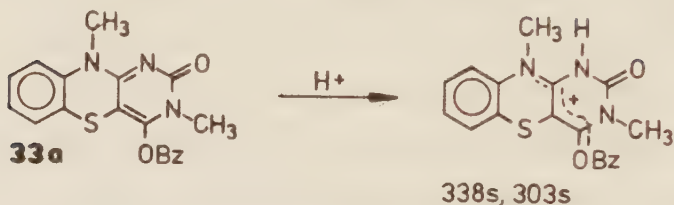
3. Bei C(4a)-Derivaten ist das 8π -Elektronensystem des Thiazinringes nicht mehr erhalten, so daß deren Oxidation zu Kationradikalen wegen fehlender Planarisierung und Mesomeriefähigkeit dieses Systems nicht möglich ist. Ebenso blockieren S(5)-Derivate die saure Oxidation, da ihre Ein-Elektronen-Abgabe zu Dikationen führt, die keine Stabilität besitzen. Unter drastischen Bedingungen kann Entalkylierung erfolgen, unter Bildung der unsubstituierten Radikal-Kationen.

4. Das Fehlen von CO-Schwingungen im IR-Spektrum weist auf O-Alkylierung hin.

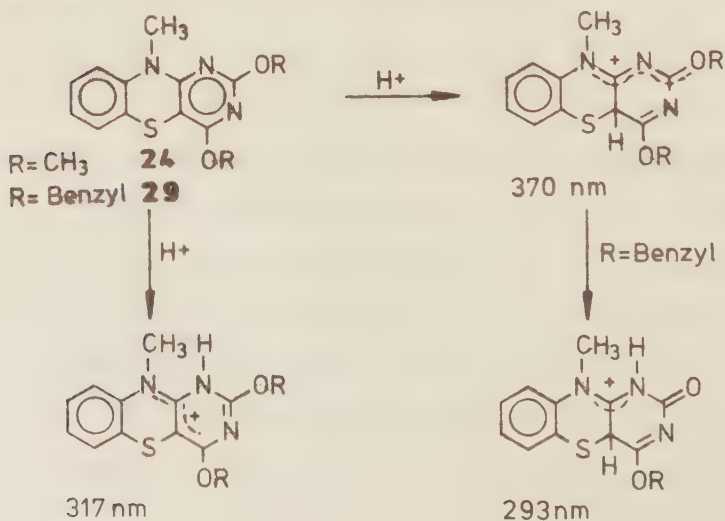
5. N-Substitution hat in erster Näherung keinen Einfluß auf den Chromophor. Im Gegensatz zu S- und O-Alkylprodukten bleibt die langwellige Endabsorption erhalten und das erste Maximum bei 280 nm wird durch Alkylreste am Stickstoff nur um wenige nm bathochrom verschoben (Tab. 2).

6. S- und O-Alkylprodukte sind mit Hilfe ihrer Kation-Elektronenspektren zu unterscheiden. Während die zwitterionischen S-Alkylverbindungen schon mit einem pK von ca. 3 am N-1 protoniert werden, liefern O-Alkylderivate abhängig von ihrem Substitutionsort in stark saurer Lösung verschiedene Elektronenspektren: O(2a),N(3)-Alkylderivate werden am C(4a) protoniert und geben den unsubstituierten Thiaflavinen analoge Spektren. Der Chromophor der O(4a),N(3)-Alkylverbindung 33 weicht jedoch im sauren wesentlich (30 nm hypsochrom) von seinem O(2a)-Isomeren ab, so daß

daraus auf N(1)-Protonierung geschlossen wird.



Die **2a,4a**-Dimethyl- und Dibenzylverbindungen **24** und **29** verhalten sich unter diesen Bedingungen verschieden. Unmittelbar nach dem Lösen weisen beide Absorptionsmaxima bei 370 und 317 nm auf. Während das Kationenspektrum von **24** stabil bleibt, wird die Benzylverbindung **29** nach C(4a)-Protonierung relativ schnell (ca 1/2 h) am O-2 desalkyliert, was aus dem Verschwinden des Maximums bei 370 nm ersichtlich ist. Die Absorption bei 317 nm bleibt dabei unverändert erhalten und wird einer gleichzeitig gebildeten N(1)-protonierten Struktur zugeschrieben.



7. O-Alkylderivate sind als Iminoester sowohl sauer, als auch alkalisch hydrolysierbar. Die alkalische Spaltung führt jedoch nicht zu einheitlichen Produkten, während die saure Hydrolyse ausschließlich die entalkylierten Verbindungen 20c und 20d liefert.

S(5)-substituierte Derivate werden ebenfalls in saurer Lösung dealkyliert. Die Abspaltung verläuft über die in saurer Lösung vorliegenden Sulfonium-Kationen, die nun nicht mehr durch eine negative Ladung intramolekular stabilisiert sind.

N-Alkylprodukte sind gegenüber saurer Hydrolyse stabil.

8. Eine Einschränkung der Anzahl möglicher Alkylprodukte ist durch Einsatz der am N-3 vormethylierten Verbindung 20d zu erreichen. Diese Methylgruppe kann mit der Totalsynthese eingeführt werden.

Tabelle 2

Verbindung	Ort der Alkylierung	Elektronenspektren		¹ H-NMR, δ (ppm)		andere Positionen
		Lösungsmittel, $\lambda_{\max}$ (nm), (log ϵ)	M ⁻¹ cm ⁻¹	N - 3	N - 10	
20 e	1 - CH ₃ 3 - CH ₃ 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 350s(3,38); 287 (3,98); 249 (4,32); 219 (4,28); HCl konz.: 366 (3,51); 291 (3,84); 251 (4,23);		3,18	3,39	N-1: 3,25
23	2 α - CH ₃ 3 - CH ₃ 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 390s(3,00); 320s(3,34); 256 (4,51); HCl konz.: 369 (3,31); 295s(3,55); 266 (4,21); 260s(4,18);		3,32	3,29	2 α : 3,97
30	2 α - Bz 3 - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 380s(3,08); 320s(3,45); 258 (4,57); HCl konz.: 368 (3,48); 292 (3,86); 252 (4,22);		5,13	3,28	2 α : 5,35
33	3 - CH ₃ 4 α - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 380s(2,90); 320s(3,39); 258 (4,78) TFE: 338s(2,95); 303s(3,49); 276 (4,21);		3,37	3,37	4 α : 5,43
24	2 α - CH ₃ 4 α - CH ₃ 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 295 (3,78); 248 (4,47); 210 (4,25); HCl konz.: 364 (3,53); 314 (3,62); 244 (4,12);		-	3,38	4 α : 3,92 2 α : 3,97
29	2 α - Bz 4 α - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 299 (3,90); 252 (4,58); HCl konz.: 372 (3,45); 317 (3,40); 293 (3,75); 251 (4,27);		-	3,35	2 α : 5,35 4 α : 5,43
32 a	3 - CH ₃ 4 α - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 334 (3,63); 306 (3,78); 273 (3,96); HCl konz.: 363 (3,10); 297 (3,79);		3,13	3,75	4 α : 3,05; 3,33 AB, J = 14 Hz
32 b	3 - Bz 4 α - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 335 (3,68); 305 (3,83); 272 (3,98); 248 (4,20); HCl konz.: 360 (3,21); 300 (3,90);		5,14 4,87 d J = 14 Hz	3,7	C-4 α : 3,06; 3,36 AB, J = 14 Hz
25	3 - CH ₃ 5 - CH ₃ 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 313s(3,52); 271 (4,27); 257 (4,38); 227 (4,28); 1 n HCl: 359 (3,79); 305 (4,28); 281 (4,30); 0,1 n HCl: 266 (4,79); 254 (4,82);		3,20	3,70	5: 2,65
31 a	3 - CH ₃ 5 - Bz 10 - CH ₃	CH ₃ OH: 315s(3,60); 266 (4,40); 0,1 n HCl: 355s(2,63); 313s(3,85); 293 (3,88);		3,02	3,30	[in CD ₃ OD] 5: 4,05; 4,23 AB, J = 12 Hz

Die Ergebnisse der Alkylierung des HsFl_{red} -Systems zeigen, daß das Thiaflavin in seiner Donator-Kapazität zwischen dem natürlichen Dihydroflavin $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ und seinem Acetylderivat liegt, dagegen ähnlich stabil gegen Oxidation ist, wie das $5\text{Ac-HFl}_{\text{red}}$. Der starke Rückgang der oxidationsempfindlichkeit gegenüber $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ ergibt sich aus der verstärkten Winkelung des 5-ständig modifizierten Systems ⁽⁸¹⁾ (32° für $5\text{Ac-HFl}_{\text{red}}$ und 21° für $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$).



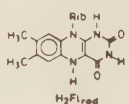
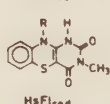
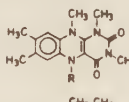
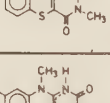
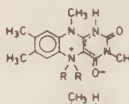
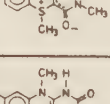
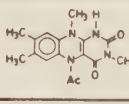
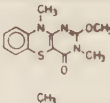
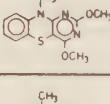
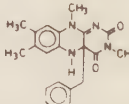
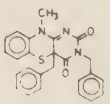
Die von HsFl_{red} eingenommene Mittelstellung wird weiter unterstrichen durch den Diederwinkel des Phenothiazin-Grundkörpers von $26,7^\circ$ ⁽⁸²⁾.

Es war daher von Interesse, die Ähnlichkeiten des Dihydroflavins mit seinen Schwefel-Analogen anhand von zwei Parametern experimentell zu testen:

1. Lage und Intensitäten der längstwelligen Absorptionsbande geben Auskunft über die Planarität des Systems.

In Tabelle 3 sind die langwelligen Endabsorptionen der Flavine mit den entsprechenden Thiaflavinen verglichen und die für die Flavine ermittelten Diederwinkel ⁽⁸¹⁾ aufgeführt.

Tabelle 3

VERBINDUNG	$\epsilon_{400 \text{ nm}}$	Diederwinkel
 H₂Fl_{red} HF_{l_red}⁻  HsFl_{red} sFl_{red}⁻	$\epsilon_{460} = 800$ 2000 1700 R=H 800 R=Methyl 520 R=Benzyl 530 320	18 °
 R=H  R=Benzyl	$\epsilon_{450} = 680$, $\epsilon_{370} = 2800$ $\epsilon_{450} = 0$ 550	21 °
 R=H  R=Äthyl	0 0 0	10 ° 9 °
 Ac	0	32 °
 OCH₃  OCH₃	800 200	
 OCH₃  OCH₃	0 200	

Es zeigt sich dabei, daß im HsFl_{red} eine wesentliche tricyclische Resonanz noch besteht, im Gegensatz zum 5-Benzyl- HFl_{red} , wenn auch schwächer als beim $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$. Anders als beim Flavin stellt sich hierbei aber die Frage, ob die langwellige Absorption wie im Falle des Flavins wirklich nur die Planarität des tricyclischen Systems reflektiert, oder ob auch der Schwefel eine Resonanz im nonkoplanaren System aufgrund der Einbeziehung von d-Orbitalen ermöglicht.

Gegen einen starken Einfluß der d-Orbitale, wie er in der Grenzform B angedeutet ist, spricht der vollständige Verlust der Endabsorption im Bereich 400 nm nach S(5)- Alkylierung (Verbindungen 25 und 31a). Die S-Alkylthiaflavine sind demgegenüber spektral vergleichbar mit den 5,5-disubstituierten Dihydroflavinen C. Die Ylidform A, welche isoelektronisch ist zu C dürfte daher die Chromophore 25 und 31a am besten wiedergeben (Tabelle 4).

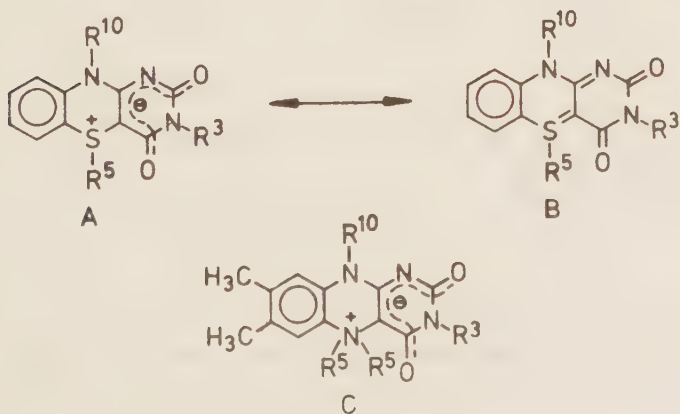
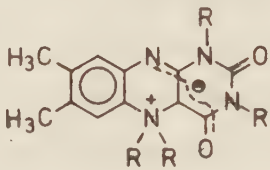
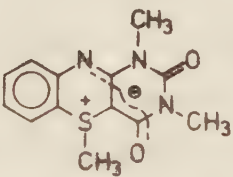
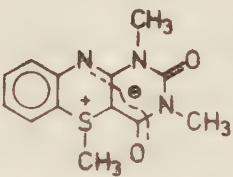
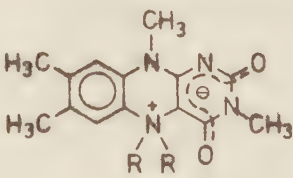
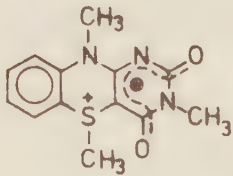
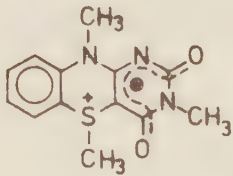


Tabelle 4

VERBINDUNG	Lösungsmittel	$\lambda_{\max}$ (nm)	pK
 	Methanol : 343, 305 6 n HCl : 315, 287⁺		6,6
	Methanol : 345, 302, 240s pH 2 : 305, 275s, 255s		4,6
 	Methanol : 310s, 293, 265 6 n HCl : 318, 292⁺		3,7
	Methanol : 313, 271, 257 pH 2 : 359, 305, 281		2,7

⁺ Beim Vergleich der Kationenspektren der Flavine und 7,8-Northiaflavine muß berücksichtigt werden, daß 7,8-Methylsubstitution eine bathochrome Verschiebung um ca. 10 nm bewirkt.

2. Die Orte des Eintritts von Alkylsubstituenten reflektieren die Relation von Grenzorbital- und Ladungskontrolle^(83,84) des elektrophilen Angriffs. Es gehört zu den Besonderheiten des natürlichen Coenzym-Chromophors, daß hier die Alkylierung selektiv an N(5) erfolgt, ungeachtet der im Pyrimidin Teilkern lokalisierten Ladung des Anions $\text{HFl}_{\text{red}}^-$. Hierin liegt die Grundlage zum Verständnis der biologischen Hydrierungsaktivität des Flavins.

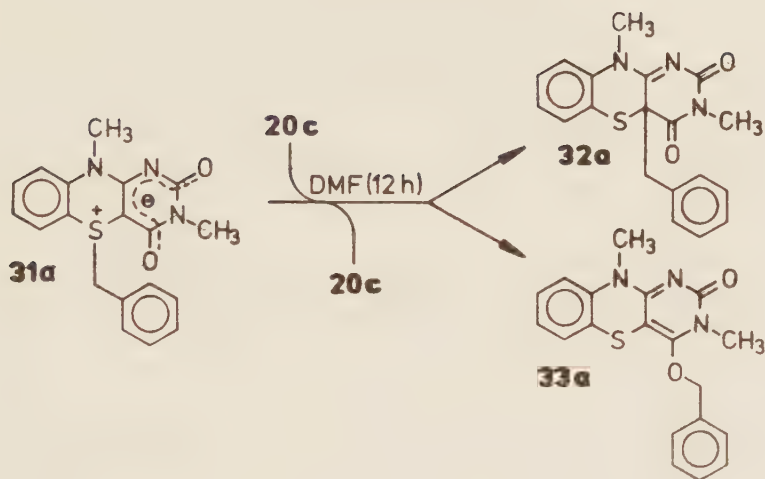
Das Thiaflavinsystem zeigt hier ein Verhalten, welches genau in der Mitte zwischen $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ und $5\text{Ac-HFl}_{\text{red}}$ liegt, nämlich eine Konkurrenz zwischen ladungskontrollierter O- und N-Alkylierung und Grenzorbital-kontrollierter S- und C-Alkylierung, alles am gleichen System, nach Aktivität des Alkylierungsmittels und Polarität des Milieus klar steuerbar. Im Flavinfall gibt das Acetylderivat reine Ladungskontrolle, das unsubstituierte oder 5-alkylierte System reine Grenzorbital kontrolle (vergleiche Seite 43). Auch das Thiaalloxazin (Formelschema 6) ist in seinen Donator-Eigenschaften zwischen dem Dihydroalloxazin und seinem 5-Acetylderivat einzuordnen, da auch hier gleichermaßen N-, O-, S- und C-Alkylierungen gefunden werden, während das Dihydroalloxazin - wie $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ - ausschließlich Grenzorbital-kontrolliert reagiert und nur durch 5-Acetylierung einem ladungskontrolliertem Angriff zugänglich wird.

4.3. Sigmatrope Alkylverschiebung an Thiaflavinen

Die Wanderung von Alkylresten innerhalb des Thiaflavin-Grundgerüstes ist zunächst aus der Produktverteilung der Benzylierung abzuleiten. Mit Benzylchlorid entsteht in Dimethylformamid/ K_2CO_3 bei 60 °C als Hauptprodukt die 4a-Benzylverbindung 32b, während mit Benzylbromid im gleichen Lösungsmittel nebeneinander je nach Reaktionszeit die 5-, 4a- und 4a-Substitutionsprodukte 31a, 32a und 33 entstehen. Nach genügend langer Reaktionszeit ist kein S-Alkylderivat 31a mehr nachweisbar.

Die Verteilung der Produkte nach Benzylierung der 3,10-Dimethylverbindung 20d kann folgendermaßen gedeutet werden: Zunächst entsteht Grenzorbital-kontrolliert S(5)- und weniger C(4a)-Alkylprodukt. In langsamer Reaktion erfolgt Umlagerung der 5-Alkylverbindung in polaren Lösungsmitteln zu 4a- und 4a-Isomeren im Sinne einer 1,2- bzw. 1,4-Verschiebung.

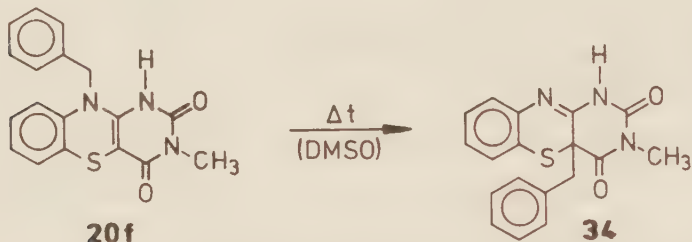
Der Nachweis einer intramolekularen Umlagerung im Gegensatz zu einer reversiblen Desalkylierung wird durch vollständige Umlagerung der S-Alkyl- (31a) in die 4a- (32a) und 4a-Alkylverbindung (33) nach 12-stündigem Rühren in Dimethylformamid erbracht. Zusätzlich beweisend für den intramolekularen Reaktionstyp ist das Fehlen einer intermolekularen Reaktion bei der Umlagerung von 31a in Anwesenheit der 10-Methylverbindung 20c als nucleophile Konkurrenzsubstrat. Auch hier entstehen quantitativ 32a und 33.



Die Identifizierung der Umlagerungsprodukte erfolgte dünn-schichtchromatographisch und durch Mischschmelzpunkt mit den bei der Alkylierung erhaltenen authentischen Substanzen.

Die durch Methylierung von 20d in Chloroform erhaltene S-Methylverbindung 25 ist ebenfalls thermolabil, jedoch ist die Umlagerung nur im Bereich der Schmelztemperatur (ca. 200 °C) zu erreichen. Unter diesen drastischen Bedingungen entstehen zu gleichen Teilen neben dem im NMR-Spektrum eindeutig zu identifizierenden C(4a)-Methylderivat eine O-Methylverbindung, der in Analogie zur Reaktion des 5-Benzylprodukts 31a die 4a-Methylstruktur zugeordnet wird und das 1,3,10-Trimethylderivat 20e.

Der 10-ständige Benzylrest der Verbindung 20f wandert in polaren Lösungsmitteln (DMSO) bei Siedetemperatur (ca. 150 °C) fast vollständig zur C(4a)-Position unter Bildung des 5-Thiaalloxazins 34, dessen Struktur NMR-spektroskopisch ermittelt wurde.



Aus der Mobilität der Alkylreste ergeben sich für das Thiaflavin folgende Eigenschaften:

Alkylthiaflavine mit gesättigten Resten sind mit Ausnahme der S-Alkylprodukte thermostabil, während der aktivere Benzylrest auch aus der 10-Position thermisch umgelagert werden kann, wobei aber die 5-Substitution die wesentlich labilere Bindung darstellt. Dementsprechend findet man aus dieser Position Umlagerung auch bei gesättigten Resten, allerdings nur unter drastischen Bedingungen. Gebildet werden zum größeren Teil C(4a)-Alkylderivate, welche - wieder in Analogie zu den Dihydroflavinen - die thermodynamisch stabilsten Alkylthiaflavine darstellen, wodurch auch die Umlagerung des 10-ständigen Benzylrestes zum C-4a verständlich ist. Die gleichzeitige Bildung von 4a-Benzylprodukten ist demgegenüber eher sterisch- und ladungskontrolliert.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen der Flavinchemie, in der durch Methylierung des 5-Benzyl-3-methyl-dihydroflavins zum 4a-Benzyl-3,5-dimethyl-flavin eine 5 - 4a-Wanderung eindeutig bewiesen werden konnte, welche über die den 5-Alkylthiaflavinen entsprechenden 5,5-disubstituierten Dihydroflavine verläuft ⁽⁷⁹⁾ .

5. Die oxidierten Stufen des Thiaflavins

Die verschiedenen Redoxstufen des Thiaflavins unterscheiden sich in ihren Eigenschaften in charakteristischer Weise von denen der Flavine. Während man in der Flavinchemie bei anaerober Reduktion von der oxidierten Stufe Fl_{ox} zum $\text{H}\dot{\text{F}}\text{l}$ bzw. $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ kommt, ist in der Thiaflavinreihe die dem $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ entsprechende Dihydrostufe das bei der Synthese erhaltene Ausgangsmaterial zur Darstellung der beiden oxidierten Stufen $\text{s}\dot{\text{F}}\text{l}$ und sFl_{ox}^+ . Die oxidierten Spezies der S(5)-Modifikation, deren Existenz aufgrund ihrer 1,4-Benzothiazin-Struktur zu erwarten sind, sollten hinsichtlich ihrer Bildung, Stabilität und Reaktivität experimentell bearbeitet werden. Davon ausgehend sollte der Modellcharakter des Thiaflavin-Redox-Systems im Vergleich zu dem der Flavine diskutiert werden.

5.1. Ein-Elektronen-Oxidation des Thiaflavin-Systems

5.1.1. Strukturen von Flavosemichinonen

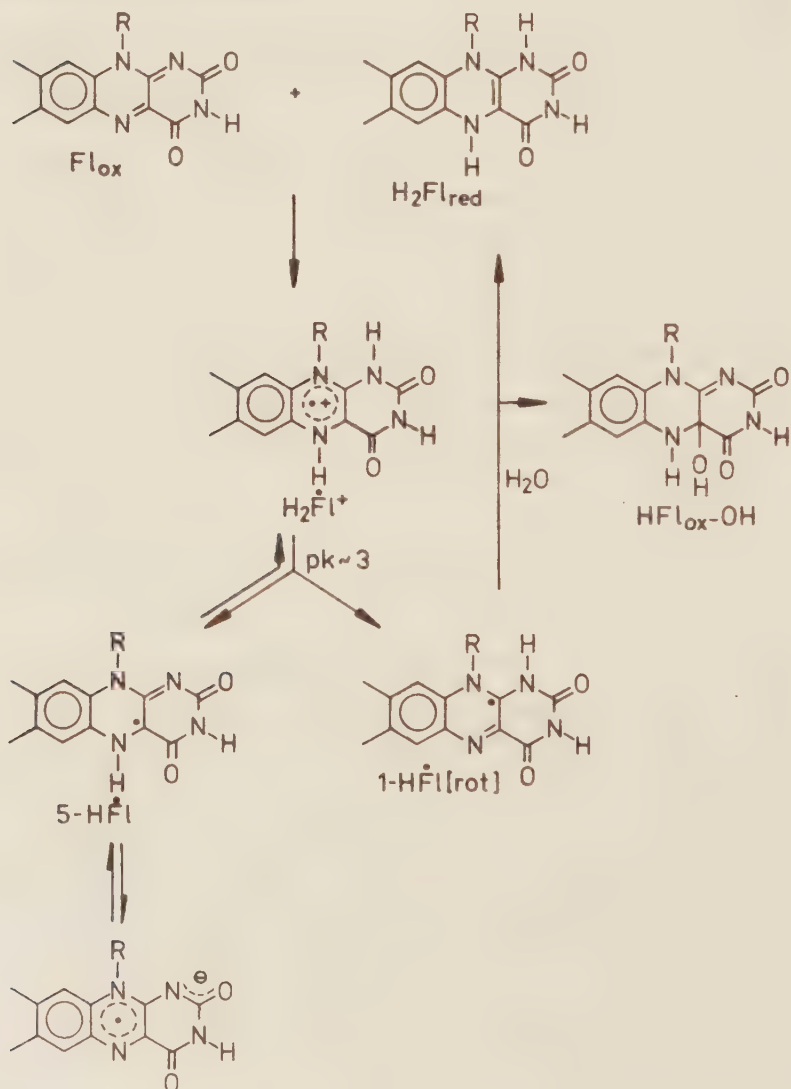
Die Frage, die sich nach der Entdeckung der Semichinonstufe des Flavins durch MICHAELIS ^(85,86) in der Flavinchemie stellte, war die nach der pH-Abhängigkeit von Struktur und Stabilität der Radikal-Stufe, welche von BEINERT ⁽⁸⁷⁾, HEMMERICH ^(88,89), MÜLLER ^(90,91) und anderen ^(92,93) mit Hilfe der ESR- und Elektronenspektroskopie bearbeitet

wurde. Die Resultate ermöglichten es, Bildung, Disproportionierungs- und Komproportionierungseigenschaften der Flavosemichinonstufe zu erfassen.

In saurer Lösung komproportionieren Fl_{ox} und $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ zu $\text{H}_2\dot{\text{Fl}}^+$. Das Gleichgewicht liegt ganz auf der Seite der Semichinonstufe und die gebildeten Radikal-Kationen sind so stabil, daß sie sogar in kristallinem Zustand gewonnen werden können (= KUHN's "Rhodoflavin")⁽⁹⁴⁾. Aus den Radikal-Kationen entstehen mit einem pK von ca. 3 Neutralradikale. Deren Tautomerstrukturen konnte mit Hilfe der Elektronenspektren entsprechend Alkyl-blockierter Analogverbindungen identifiziert werden. Die blauen Neutralradikale $\text{H}\dot{\text{Fl}}$ stimmen in ihren Spektren mit $5\text{-R}\dot{\text{Fl}}$ überein⁽⁸⁹⁾, so daß ihnen die Struktur $5\text{-H}\dot{\text{Fl}}$ zugeordnet wird. Deprotonierung der blauen Radikale mit einem pK von 8,5 liefert rote Radikal-Anionen $-\dot{\text{Fl}}^-$, deren Stabilität mit $5\text{-H}\dot{\text{Fl}}$ vergleichbar ist, sich aber von der der Kationradikale $\text{H}_2\dot{\text{Fl}}^+$ wesentlich unterscheidet. Die roten Neutralradikale besitzen die Tautomerstruktur $1\text{-H}\dot{\text{Fl}}$. Dieser Typ ist dadurch gekennzeichnet, daß er aufgrund der höheren Acidität am N-1 und größeren Basizität am N-5 in wässrigem Milieu disproportioniert.

Daraus ergeben sich für die biologische Relevanz der Flavosemichinonstufe folgende Schlußfolgerungen⁽³⁰⁾: Die semichinoide Form der Flavine ist über den gesamten biologisch relevanten pH-Bereich stabil. Angriff durch einen Alkylrest in 5-Stellung stabilisiert die Radikalbildung und drängt damit den $2e^-$ -Transfer zurück, während Blockierung der 1- oder

2a-Position die Radikalbildung zurückdrängt und so den $1e^-$ -Transfer blockiert. Derartige Steuerungen sind innerhalb des Proteins durch spezifische Wasserstoffbrücken denkbar.



5.1.2. Thiaflavin-Radikale

Thiaflavin-Semichinone sind als isochrome Systeme zu Flavin- und Thialloxazin-Radikalen anzusehen. Dementsprechend sollten die halboxidierten Formen - $\text{HsFl}^{\bullet+}$ und $\text{sFl}^{\bullet-}$ - den bekannten Analogverbindungen vergleichbare Stabilitäten und Reaktivitäten besitzen.

5.1.2.1. Radikal-Kationen

Die Herstellung von Kationradikalen der Thiaflavine ist auf verschiedenen Wegen möglich und liefert in z.T. zeitabhängiger Reaktion hohe Radikalausbeuten. Der Nachweis von $\text{HsFl}^{\bullet+}$ erfolgt zunächst ESR- und Elektronenspektroskopisch (siehe Abschnitt 3.3). Weitere Untersuchungen zur Kinetik ihrer Bildung bzw. Disproportionierung können ausreichend spezifisch mit Hilfe der UV/VIS-Spektren beschrieben werden.

Um die Radikalausbeute quantitativ abschätzen zu können, ist es nötig, deren Bildung auf mehreren Wegen unabhängig voneinander zu erreichen.

Folgende Darstellungsmethoden wurden näher verfolgt:

1. Oxidation durch Luftsauerstoff in Trifluoressigsäure (TFE), 2. Oxidation mit Dibenzoylperoxid in TFE, 3. Oxidation mit Br_2 in Eisessig,
4. Oxidation in H_2SO_4 und 5. Komproportionierung von HsFl_{red} und seinem Sulfoxid in TFE.

1. Luftoxidation von $\text{H}_2\text{sFl}_{\text{red}}^+$ führt in langsamer Reaktion (ca. 48 h), deren Geschwindigkeit von Konzentration und Luft-Sauerstoff-Zufuhr abhängig ist, zu HsFl^+ 35 (Abb. 13).

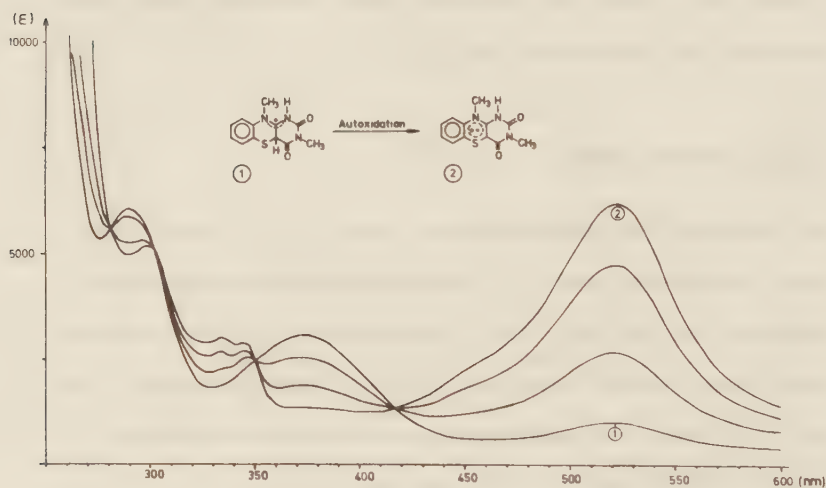
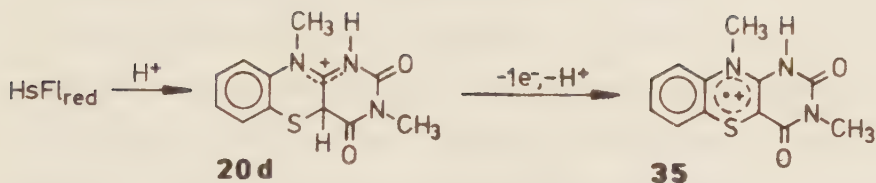


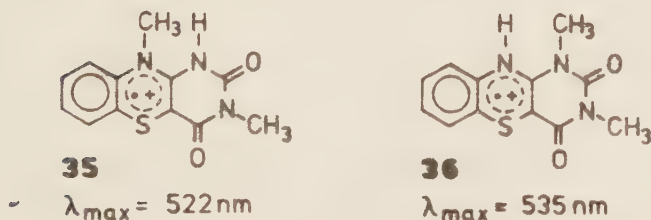
Abb. 13: Kinetik der Luft-Sauerstoff-Oxidation von 20d in TFE

Diese Darstellungsmethode ist relevant, da hierbei keine Nebenreaktionen mit Reagenzien möglich sind und reines Radikal-Kation quantitativ gebildet wird, welches elektronenspektroskopisch gut charakterisiert werden kann, da keine weiteren Chromophore in der Lösung anwesend sind.

Das tiefviolette Kationradikal 35 ist durch Absorptionsmaxima bei 522 (6200), 345 (2990), 334 (3000) und 299 nm ($\epsilon = 5200$) charakterisiert (Kurve 2, Abb. 13), wie aus dem isosbestischem Verlauf der Kinetik zu entnehmen ist.

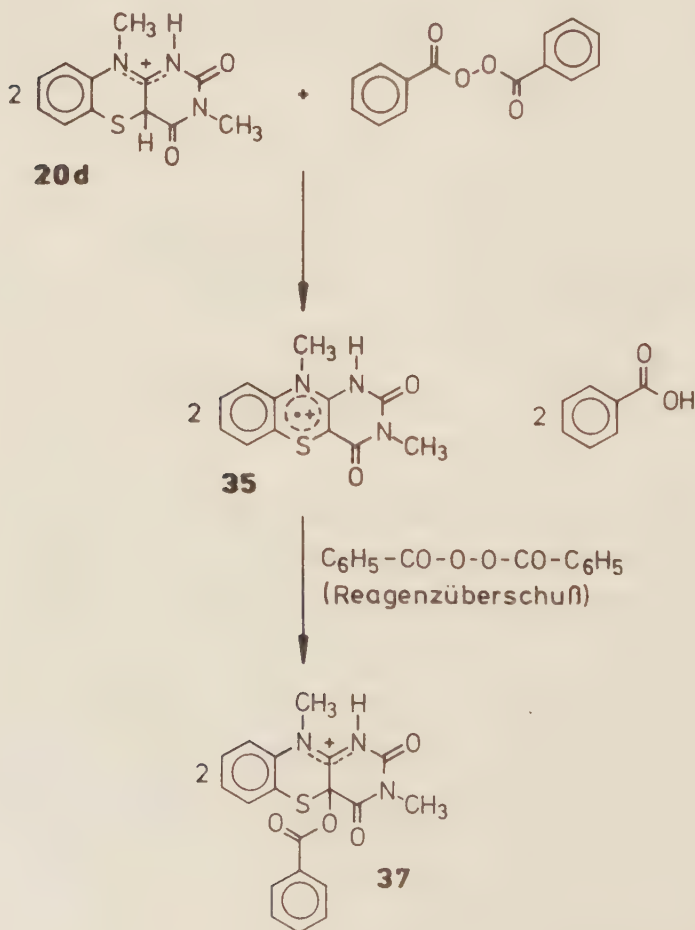


Der Vergleich der Absorptionsmaxima von 35 mit seinem 10-ständig unsubstituierten Derivat 36 - dem Thiaalloxazin-Radikal-Kation - beweist die Isochromie beider Isomeren.



2. Die Reaktion von $\text{H}_2\text{sFl}_{\text{red}}^+$ mit Benzoylperoxid ist schnell und führt mit einem Mol-Äquivalent Oxidationsmittel zu ca. 90 % Radikalausbeute. Bei Verwendung eines Überschusses Oxidationsmittel kann gezeigt werden, daß Reaktion des entstehenden Radikals mit Reagens eintritt, die auch dessen quantitative Bildung verhindert. Das Radikal reagiert dabei offensichtlich zu einem 4a-Addukt weiter. Aus der Abnahme der Absorption bei 522 nm ist die Umsetzung des Radikal-Kations mit Reagensüberschuß

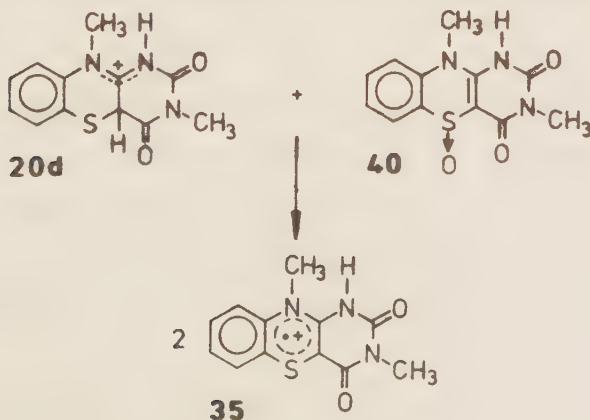
abzulesen, die nach ca. 20 h beendet ist. Den Nachweis einer Oxidationsreaktion und nicht eines Angriffs der gleichzeitig entstehenden Benzoesäure liefert die vollständige Stabilität des durch äquimolare Mengen Oxidationsmittel gebildeten Radikals. Die Formulierung des 4a-Benzoataddukts 37 ergibt sich aus dem Absorptionsmaximum bei 305 nm, das bei vergleichbaren 4a-Alkoxystrukturen in saurem Milieu ebenfalls auftritt.



3. Oxidation von 20d mit Brom in Eisessig führt zur Bildung eines violetten Niederschlages, der in Trifluoressigsäure das Absorptionsspektrum des Radikal-Kations aufweist. Aus der Elementaranalyse der Substanz ergibt sich die stöchiometrische Zusammensetzung $\text{HsFl}^{\dot{+}} \text{Br}^- \cdot \text{Br}_2$. Das Radikalbromid erweist sich als geeignete Vorstufe zur Darstellung von 4a-Addukten.

4. Die Bildung der Radikal-Kationen in konzentrierter Schwefelsäure ist mit der Luftoxidation in Trifluoressigsäure vergleichbar, demgegenüber aber wesentlich schneller und liefert ebenso stabile Lösungen von $\text{HsFl}^{\dot{+}}$. Die Nachteile dieser Methode liegen lediglich in der begrenzten Verwendbarkeit der Schwefelsäure als Solvens.

5. Ein stabiles Oxidationsprodukt des Thiaflavins ist dessen Sulfoxid 40, welches mit Hilfe der für diese Substanzklasse typischen Darstellungsmethoden gewonnen werden kann, z.B. durch Oxidation mit H_2O_2 (30 %) in Aceton. Das Sulfoxid bietet sich für das Dihydrosystem als geeigneter Reaktionspartner zur Untersuchung des Komproportionierungsgleichgewichtes an.



Die Reaktion von 20d und 40 zu 35 verläuft langsam, führt aber zur quantitativen Bildung der Semichinon-Stufe (Abb. 14). Daraus ergibt sich, daß in stark saurer Lösung die Stabilität der oxidierten und reduzierten Produkte zugunsten der Radikal-Kationen verschoben ist.

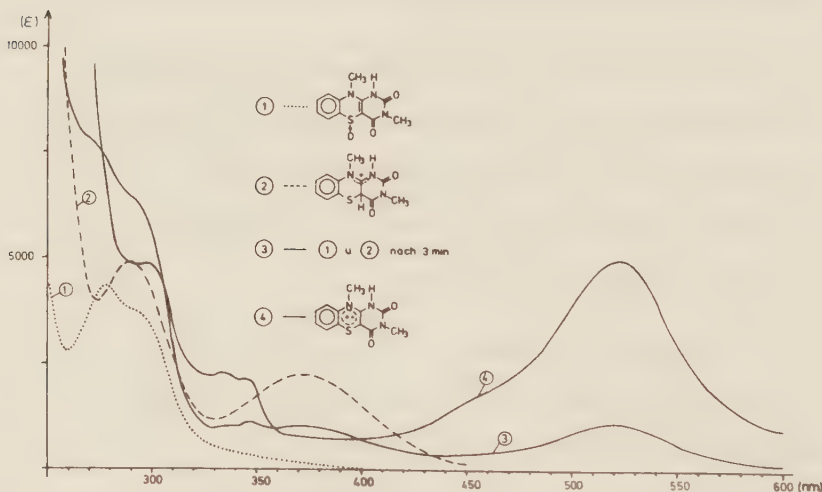


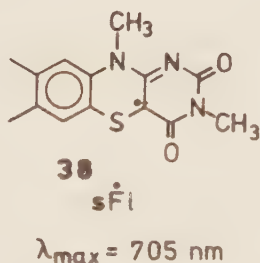
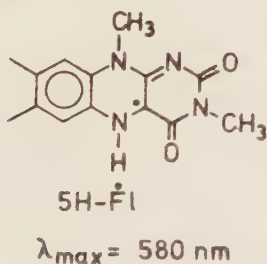
Abb. 14: Komproportionierung von 20d und 40 in Trifluoressigsäure zu 35 (=Kurve 4, aus 1 + 2 nach 2 h)

Der Variation des Lösungsmittels sind für das Thiaflavin enge Grenzen gesetzt: Lediglich in konz. Schwefelsäure wird auch 100 %ige Komproportionierung gefunden. Bei pH 1, d.h. in saurer wässriger Lösung liegt dagegen das Gleichgewicht vollständig auf der Seite von HsFl_{red} und $\text{HsFl}_{\text{ox}}-\text{O}$. Demnach ist für das Gelingen der Komproportionierungsreaktion vorherige Pro-

tonierung von HsFI_{red} erforderlich, welche aber nur in konz. Mineralsäuren bzw. Trifluoressigsäure nachgewiesen werden kann.

5.1.2.2. Neutralradikale

Das Radikal-Kation 35 geht bei Deprotonierung in das Neutralradikal $s\dot{\text{FI}}$ über, für das nur die den blauen Radikalen $5\text{H}-\dot{\text{FI}}$ analoge Struktur 38 in Frage kommt.



Neutralisation von HsFI^+ in wässriger Lösung führte nicht zu einem stabilen Neutralradikal, da unter diesen Bedingungen irreversible Disproportionierung eintritt. Dagegen gelingt die Bildung in aprotischen Lösungsmitteln: Bei Verdünnung einer sehr konzentrierten Lösung (ca. 1 M) von HsFI^+ in Trifluoressigsäure mit Chloroform entsteht das gewünschte Produkt 38, allerdings nur in einer Ausbeute von ca. 5 %, wobei im übrigen Disproportionierungsgemisch erhalten wird. Die Berechnung der Radikalausbeute wurde ESR-spektroskopisch durchgeführt ⁽⁶⁹⁾.

In Abb. 15 und 16 sind die ESR-Spektren der Kation- und Neutralkörper

der Thiaflavin- und Thiaalloxazin-Radikale abgebildet, und in Tabelle 5 die dazu gehörenden Kopplungskonstanten aufgeführt.

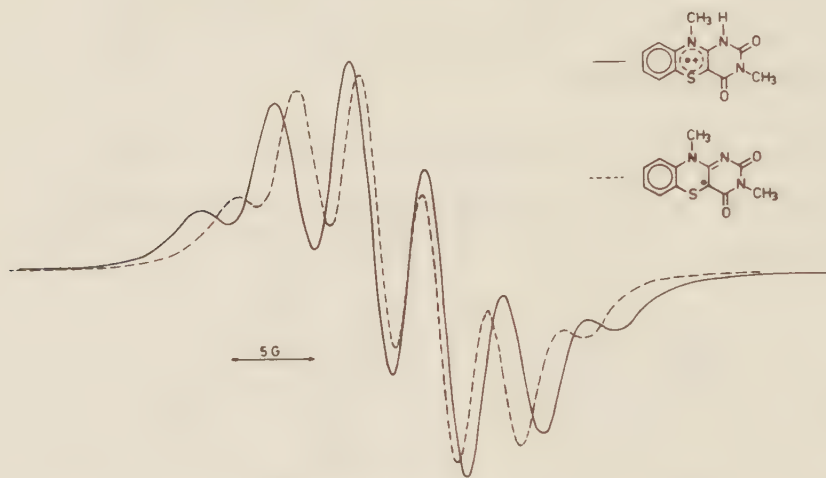


Abb. 15: ESR-Spektrum von 35 und 38

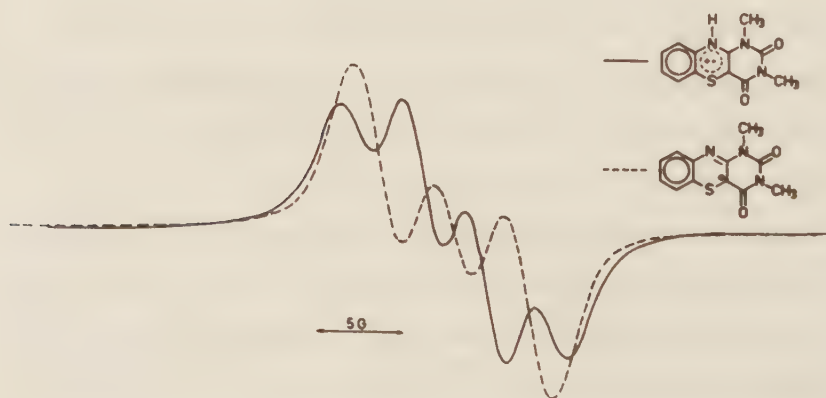
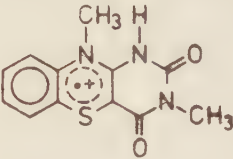
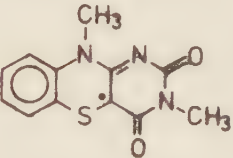
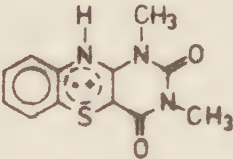
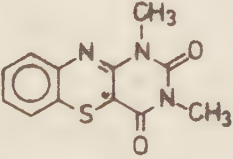


Abb. 16: ESR-Spektrum von 36 und 39

Tabelle 5

VERBINDUNG	Lösungsmittel	Linienzahl	Kopplungs- konstante
	TFE	6	4,5
	TFE/D	6	4,5
	CHCl ₃	6	4,5
	TFE	4	3,63
	TFE/D	3	3,88
	CHCl ₃	3	4,88

Die ESR-Spektren der Thiaflavine zeigen bei N(10)-Methylsubstitution eine Aufspaltung in 6 Linien, deren Kopplungskonstanten bei den deprotonierten Systemen geringer werden. N-10 ist also am Radikal-Kation ein Ort höherer Spindichte als bei der neutralen Spezies.

Umgekehrt verhält sich das 5-Thiaalloxazin-Radikal. Während das Kation eine Kopplungskonstante von 3,9 G aufweist, bringt in diesem Falle

Deprotonierung eine Erhöhung der Kopplungskonstante mit sich.

Weiter zeigt der Vergleich der Elektronenspektren der Neutralkörper 38 und 39 die Verschiedenheit beider Chromophore (Abb. 17).

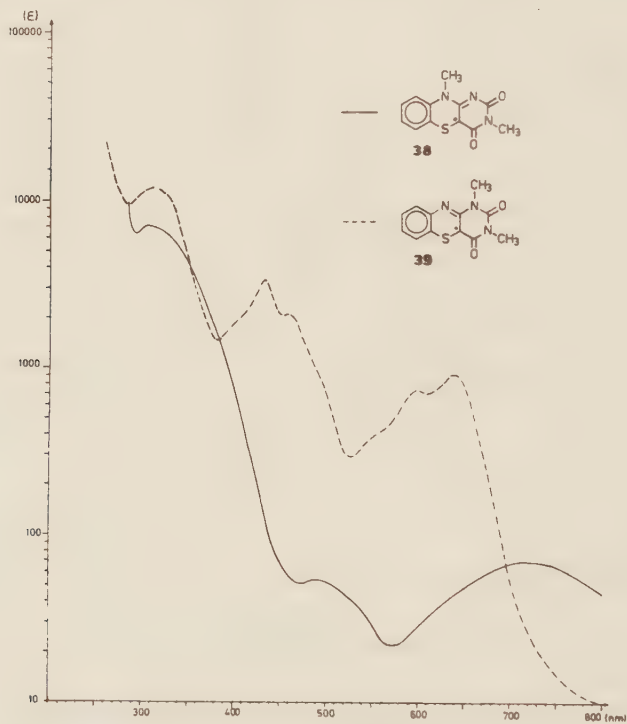
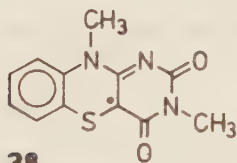


Abb. 17: Elektronenspektrum von 38 und 39 in Chloroform
(ca. 5 % Radikalanteil, 95 % Disproportionierungsgemisch)

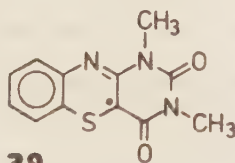
Die bathochrome Verschiebung bei Substitution der 10-Position ist zurückzuführen auf die Erweiterung des Chromophors unter Einbeziehung von O-2,

die vergleichbar ist mit der großen Blauverschiebung von $5H-\dot{F}l$ gegenüber $1H-\dot{F}l$.



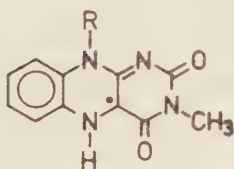
38
(hellgrün)

$\lambda_{\max} = 705 \text{ nm}$



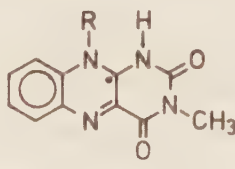
39
(grünblau)

$\lambda_{\max} = 640 \text{ nm}$



5H- $\dot{F}l$ (blau)

$\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$



1H- $\dot{F}l$ (rot)

$\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$

Die Erhöhung der Resonanz des konjugierten Systems kann aber keine nennenswerte Spindelokalisation zum N-1 zur Folge haben, da sich das auf die Feinstruktur des ESR-Spektrums von $s\dot{F}l$ auswirken würde und ein 13-Linien-Spektrum ergäbe. Die Verringerung der Kopplungskonstanten ist also ausschließlich auf eine erhöhte Spindelokalisation in den benzoiden Teil-kern zurückzuführen.

Die obigen Ergebnisse beweisen die Existenz von $s\dot{F}l$ und geben die Grundlage für weitere Untersuchungen auf Stabilität und Acidobasizität des Thiaflavin-Neutralradikals unter biologisch relevanten pH-Bedingungen.

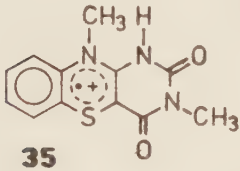
Verbindung 21a ist inzwischen in das 5-Thia-FMN überführt worden und es wird angestrebt, das modifizierte Coenzym in Apoproteine einzubauen. Erste Untersuchungen zeigen, daß Protein-gebundene Neutralradikale außerordentliche Stabilitäten besitzen ⁽⁹⁵⁾.

5.1.2.3. Ein-Elektronenoxidation von Alkyl-Thiaflavinen

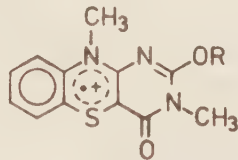
Alkyl-Thiaflavine lassen sich unterscheiden in Redox-aktive und Redox-inaktive Systeme. 4a- und 5-Substitution blockieren die Radikalbildung. Substitution der Positionen 1, 2a, 3 und 4 beeinflusst die $1e^-$ -Oxidationsfähigkeit des Systems nicht wesentlich. In saurer Lösung entstehen hier Radikal-Kationen, welche wegen fehlender acider Protonen nicht in ihre neutralen Spezies überführt werden können.

Alkylthiaflavin	$\lambda_{\max}$ (nm) des Radikal-Kations	Kopplungskonstante /G im ESR-Spektrum
3, 10-Dimethyl- (20d)	522	4,5
1,3-Dimethyl- (20b)	535	3,6
1,3, 10-Trimethyl- (20e)	543	4,5
2a,3, 10-Trimethyl- (23)	543, 645s, 705s	4,9
2a,4a, 10-Trimethyl- (24)	538, 640s	4,9

Die Chromophore der 2a-alkylierten Derivate beziehen die (2)-C-OR Gruppe ein und erklären so die bathochrome Verschiebung um ca. 20 nm.



522nm



543, 645 s

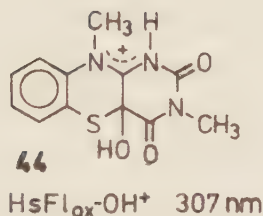
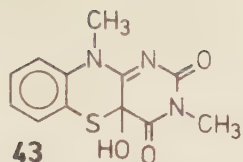
Wie aus den Kopplungskonstanten im ESR-Spektrum zu entnehmen ist, bewirkt die Delokalisierung der positiven Ladung innerhalb des Moleküls aber keine erkennbare Spindichteverringering im Thiazinring.

5.2. Zwei-Elektronen-Oxidation des Thiaflavin-Systems

In der Flavinchemie ist die oxidierte Stufe Fl_{ox} wegen ihrer ausgeprägten Lichtabsorption (λ_{max} : 450 nm), typischen Fluoreszenz und O_2 -Stabilität die best bekannte und untersuchte Form des Flavins. Dennoch ist Fl_{ox} lediglich bei der (De)hydrogenierung, die durch den Angriff eines Anions an Fl_{ox} eingeleitet wird, an der Flavin-abhängigen Oxidoreduktion beteiligt. Bei der O_2 -Aktivierung stellt Fl_{ox} nur das Endprodukt der Reaktion von $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ mit O_2 dar, während der e^- -Transfer ausschließlich über die beiden niedrigeren Redoxstufen HFl und $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}$ abläuft (96 - 101).

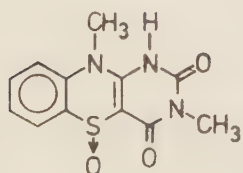
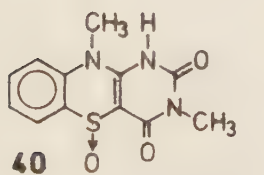
Am Thiaflavin-System sind drei verschiedene oxidierte Strukturen zu unterscheiden: sFl_{ox}^+ (Thiaflavochinon 42), $\text{HsFl}_{\text{ox}}-\text{O}$ (Thiaflavin-Sulfoxid 40) und $\text{sFl}_{\text{ox}}-\text{OH}$ (Thiaflavin-Pseudobase 43).

Sulfoxid und 4a- OCH_3 -Addukt 41, als Derivat der Pseudobase, können durch Oxidation aus der reduzierten Stufe mit H_2O_2 bzw. durch Reaktion des Kationradikal-Bromids mit Methanol gewonnen werden. In beiden Fällen sind die Ausbeuten hoch. Die Bildung der OCH_3 -Verbindung 41, welche als Disproportionierung des Radikal-Kations in 41 und reduzierten Materials verstanden werden muß, verläuft dagegen quantitativ, was auf die oxidierende Wirkung von Br_2 im Radikalbromid zurückzuführen ist. Die Strukturen des Sulfoxids 40 und des Methoxyaddukts 41 sind durch NMR-, Massen- und IR-Spektren und Elementaranalysen gesichert.



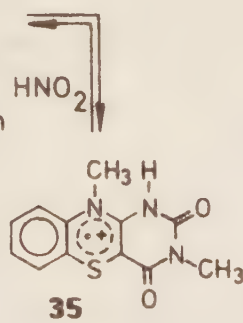
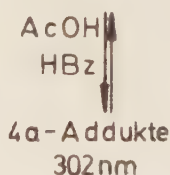
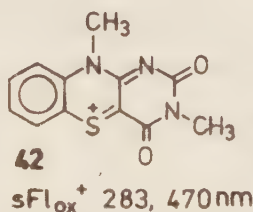
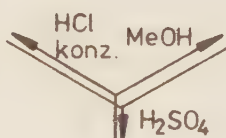
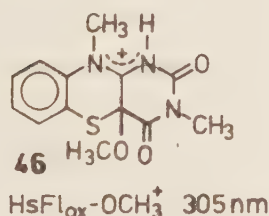
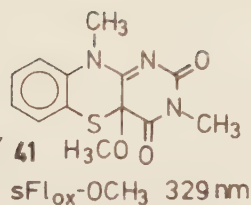
12 N HCl

H₂SO₄
H₂O

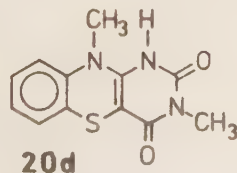
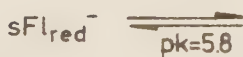


pH 0-5

DIREKT-
SYNTHESE



H₂O₂
DIREKT-
SYNTHESE



Aus 40 und 41 ist das Thiazonium-Kation 42 zugänglich, mit dessen Hilfe die Untersuchung der Konkurrenz der Positionen 4a und 5 gegenüber Nucleophilen, pH-Abhängigkeit der Stabilität so erhaltener Addukte sowie die Kinetik ihrer Umwandlung ineinander ermöglicht wird (Formelschema 9). Hierin liegt die besondere Bedeutung der isolierbaren Produkte 40 und 41.

Das Sulfoxid 40 läßt sich als relativ starke Säure mit einem pK von $4,3 \pm 0,1$ (Elektronenspektroskopische Bestimmung anhand der Absorption bei 253 nm) zu sFl_{ox}^- deprotonieren. Basische Eigenschaften besitzt das Sulfoxid dagegen nicht. Die in konz. Mineralsäuren eintretende O(5)-Protonierung ist irreversibel und hat abhängig vom Medium (H_2SO_4 bzw. HCl konz.) spontane Dehydratisierung bzw. Umlagerung zum Pseudobasen-Kation 44 zur Folge (Abb. 18).

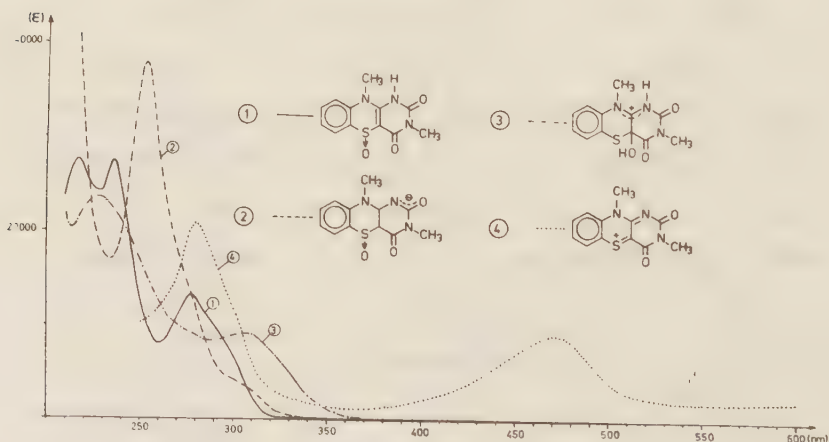
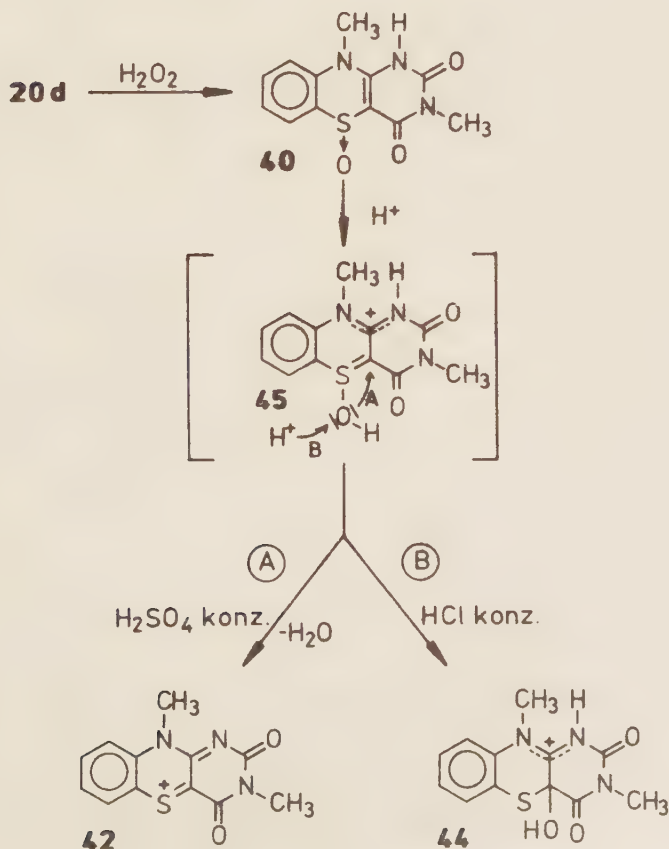


Abb. 18: Elektronenspektrum von 40 in Methanol (1), 0,1 n NaOH (2), 12 n HCl (3) und konz. H_2SO_4 (4).

Aus dem als 45 formulierten Sulfoxid-Kation wird die Bildung beider Spezies 42 und 44 verständlich: In konz. H_2SO_4 blockiert O-Protonierung den nucleophilen Angriff an C-4a. Das hat Stabilisierung zum Sulfonium-Kation 42 unter N(1)-Deprotonierung zur Folge. In konz. HCl dagegen führt Addition in 4a-Position zur protonierten Pseudobase, deren Entstehung im Sinne einer Pummerer Umlagerung ⁽¹⁰²⁾ entweder als sigmatrope Verschiebung oder als nucleophiler Angriff des Lösungsmittels erklärt werden kann.



Die zweite stabile Struktur des oxidierten Thiaflavins, das 4a-OCH₃-Addukt 41, ist mit einem pK_a 0 protonierbar und weist in wässrigen Säuren nur unterhalb des pK_a's Stabilität auf. Unter Umgehung des kritischen sauren pH-Bereichs ist die Protonierung rückstellbar. In konz. Schwefelsäure geht das Kation 46 - wie das Sulfoxid - unter Elimination von Methanol in sFl_{ox}⁺ 42 über.

Als Acetal wird 41 in verdünnten Säuren hydrolysiert. Zwischenprodukt dieser Spaltung ist die Pseudobase 43 (Hemiacetal), welche unter diesen Bedingungen irreversibel unter Spaltung der C(4a)-S-Bindung weiterreagiert. Die Pseudobase ist nur in ihrer protonierten Form HsFl_{ox}⁺-OH⁺ 44 spektral fassbar und wird beim Verdünnen von sFl_{ox}⁺ mit konz. HCl erhalten.

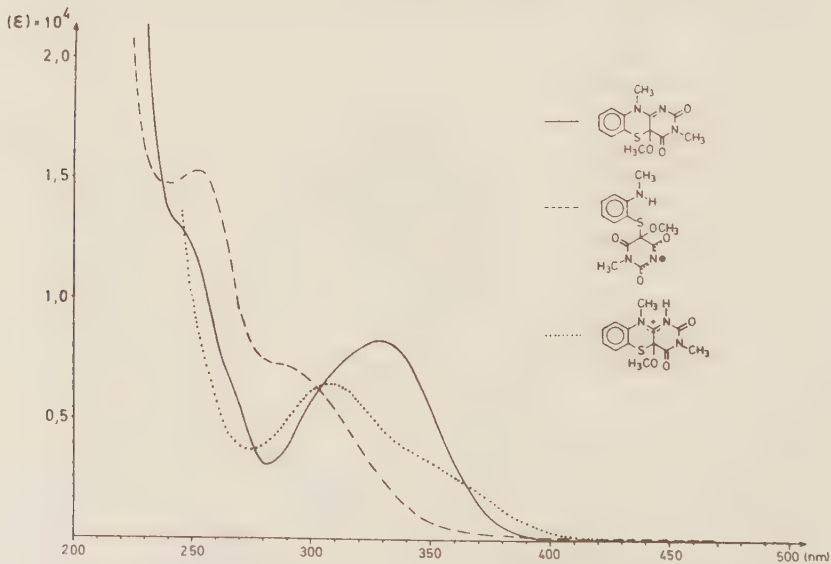
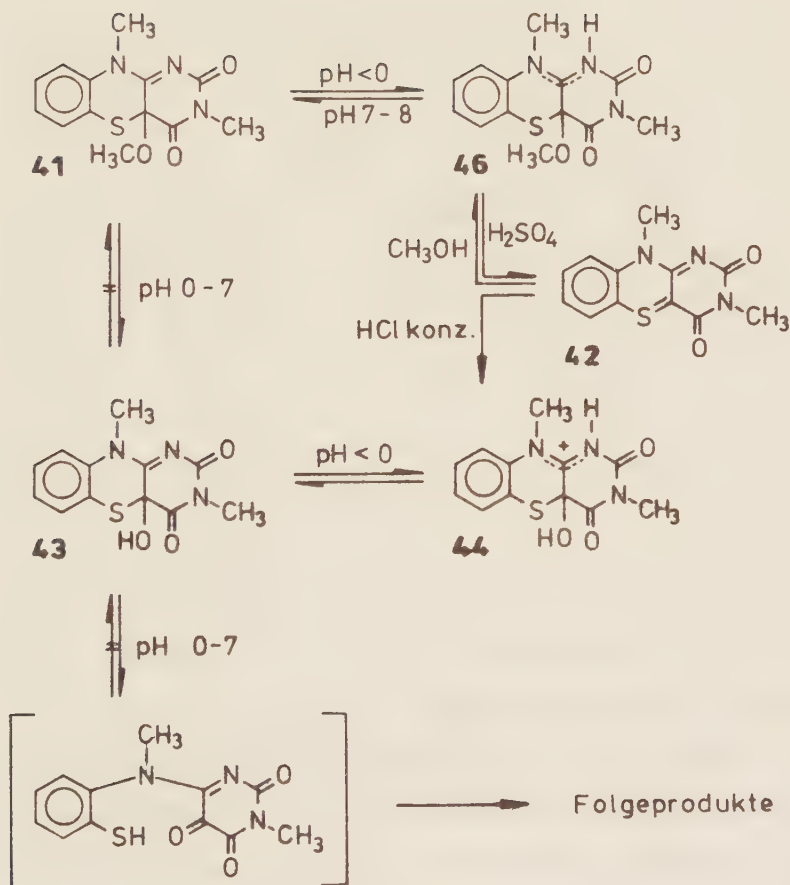
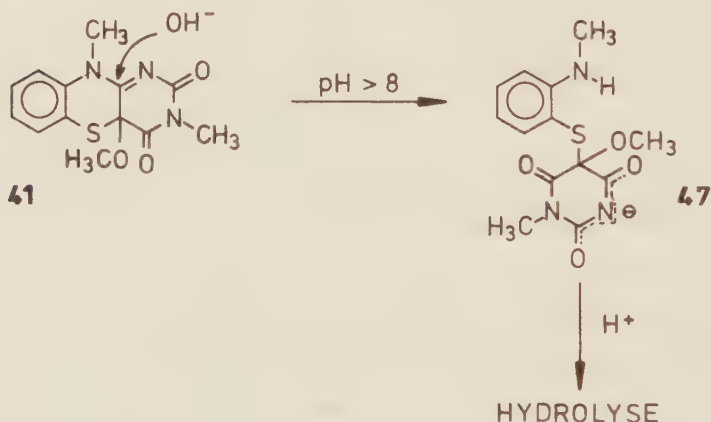


Abb. 19: Elektronenspektren von 41 in Methanol (—), 0,1 n NaOH (---) und Trifluoressigsäure (.....).



Dem kritischen sauren pH des Acetals entspricht der alkalische pH-Bereich der Hydrolyseempfindlichkeit des Amidins. Ab pH 8 erfolgt Ringöffnung durch nucleophilen Angriff in 10a-Position unter Bildung von 47, dessen

Struktur sich durch Vergleich mit entsprechenden Aryl-pyrimidyl-sulfiden aus der Thiaflavinsynthese (Verbindungen 19) ergibt. 47 ist, entsprechend dem Acetal 41, ebenfalls säurelabil.



Allen oben beschriebenen oxidierten Thiaflavinen ist gemeinsam, daß sie in konz. H_2SO_4 in das gelbgrüne Sulfoniumkation sFl_{ox}^+ übergehen, das das dem Fl_{ox} nächst verwandte Thiaflavin-System darstellt. Die stark oxidierende Wirkung von sFl_{ox}^+ führt dazu, daß es selbst unter diesen Bedingungen unter Autoreduktion in langsamer Reaktion das Radikal-Kation bildet, die in diesem Milieu stabilste Form des Thiaflavins.

Das Sulfonium-Kation 42 besitzt im Elektronenspektrum zwei ausgeprägte Maxima bei 470 und 283 nm, woraus die Verwandtschaft zum Fl_{ox} -Chromophor ersichtlich ist (Abb. 20).

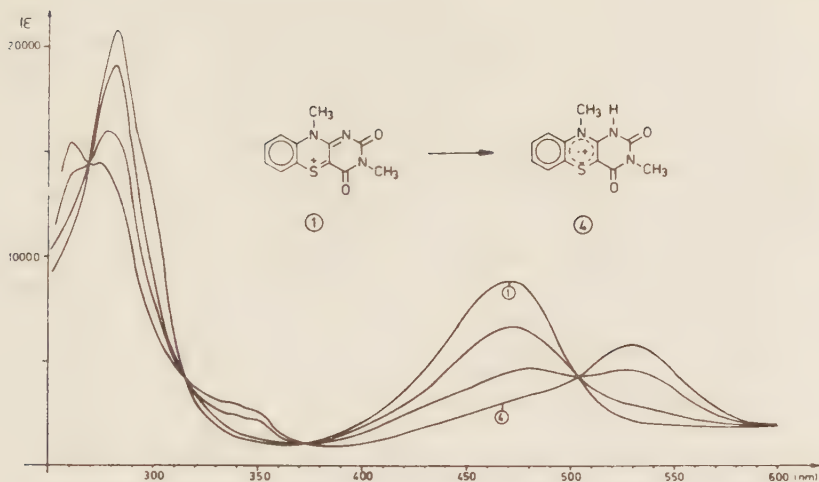


Abb. 20: Elektronenspektrum von 40 in konz. H_2SO_4 sofort gemessen (1), 12 h, 36 h und 48 h (4).

Chemisch charakterisiert ist sFl_{ox}^+ durch seine außerordentliche Reaktivität gegenüber protischen Reagenzien wie Wasser, Methanol, Eisessig und Trifluoressigsäure. Hierbei bilden sich stabile 4a-Addukte, wie der Vergleich des Methanol-Adduktes mit dem auf anderem Wege synthetisierten Material zeigt. Eine ähnliche Absorption weist auch das Acetat- und Trifluoracetat-Addukt auf, welche aber als Ester der instabilen Pseudobase hydrolyseempfindlich sind (Abb.21).

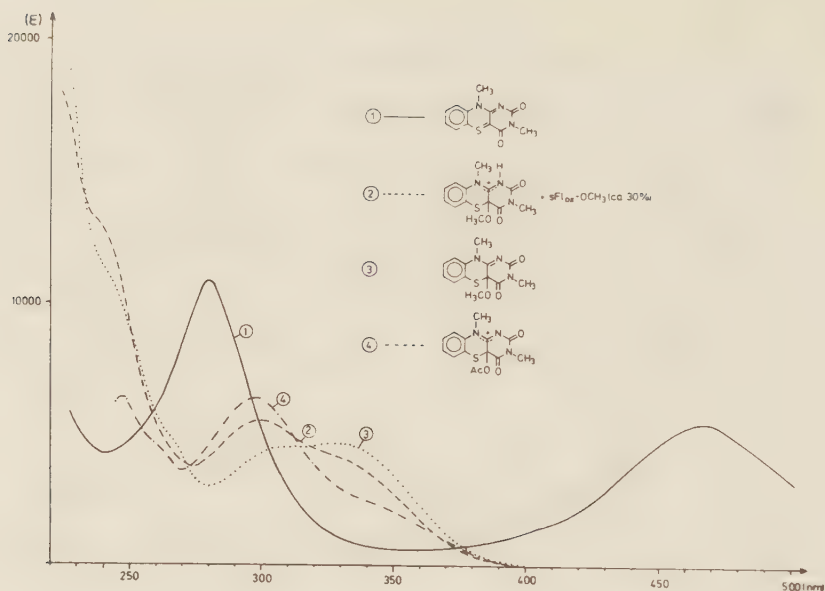
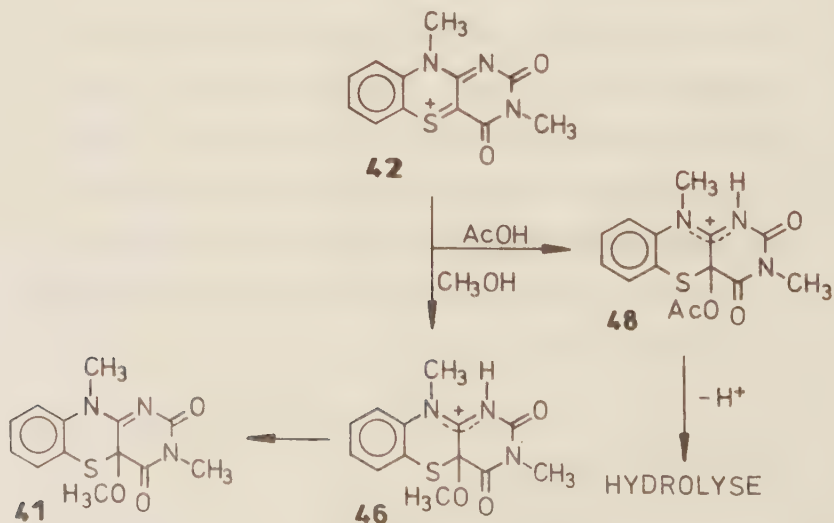


Abb. 21: Elektronenspektrum von 40 in konz. H_2SO_4 (1), 1:10-Verdünnung mit Methanol (2), 1:2-Verdünnung von (2) mit Phosphatpuffer pH 7 (3) und 1:10 Verd. von (1) mit Eisessig (4).



Bei der kovalenten Hydratation dagegen konkurrieren die Positionen 4a und 5 pH-abhängig um das Substrat: Verdünnung der konz. schwefelsauren Lösung des Thiazonium-Kations mit Wasser (1:10) führt nahezu quantitativ zum Sulfoxid 40. Umsetzung mit wässriger konz. Mineralsäure (HCl konz.) hat demgegenüber Bildung des Pseudobasenkations 46 zur Folge. Der kritische pH für diese Konkurrenzreaktion liegt bei ca. -1.

Eine 1,2-Verschiebung, d.h. reversible Umwandlung von Pseudobase in Sulfoxid und umgekehrt, kann unter diesen Bedingungen wegen des unterschiedlichen Verhaltens in Hydrolysereaktionen, ausgeschlossen werden. Umwandlung ist lediglich unter Rückbildung von sFl_{ox}^+ möglich, und damit an das extreme Milieu der Stabilisierung von sFl_{ox}^+ gebunden (Abb. 22).

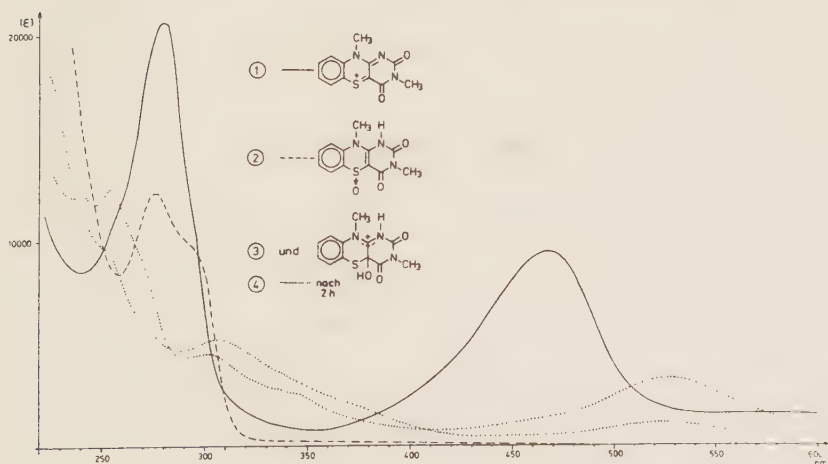
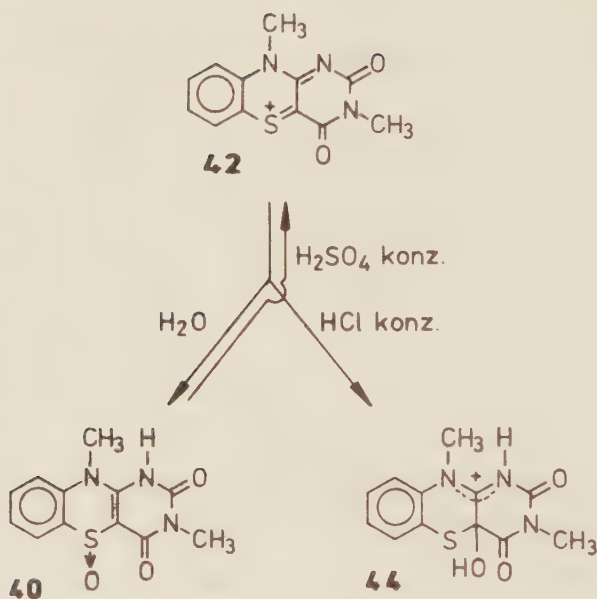


Abb. 22: Elektronenspektren von 40 in konz. H_2SO_4 (1), 1:10-Verdünnung mit H_2O (2), 1:10-Verdünnung von (1) mit 12 n HCl, sofort gemessen (3) und nach 2 h (4).



5.3. Stabilität und Reaktivität der oxidierten Stufen

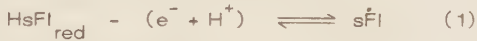
Kinetische Untersuchungen des Thiaflavin-Redoxsystems ergeben, daß neben dem reduzierten HsFl_{red} und halboxidiertem $\text{sFl}^{\cdot}$ drei verschiedene Spezies mit der Oxidationsstufe des Fl_{ox} existieren.

Das formal der Flavochinonstruktur entsprechende Thiazonium-Kation ist als extrem elektrophiles System nicht stabil. In Abhängigkeit von pH und Solvens bilden sich 4a-OR-Addukte, bzw. Sulfoxide.

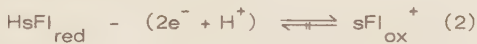
Durch Selbstreduktion bzw. Autoxidation entstehen in stark saurer Lösung Radikal-Kationen, welche unter diesen Bedingungen die stabilste Form

des Thiaflavins darstellen. Deprotonierung von HsFl^+ zum Neutralradikal hat irreversible Disproportionierung zum HsFl_{red} und Sulfoxid bzw. 4a-Addukt zur Folge.

Hieraus ergibt sich für das Verhalten der Thiaflavine in biologischen Redoxketten, daß der Radikalelektronen-Transfer



im Vergleich zur Hydrid-Abgabe



wegen der extrem hohen Acidität des Sulfonium-Kations sFl_{ox}^+ stark begünstigt wird. Die Hydrid-Abgabe nach Gleichung (2) kann nicht thermodynamisch reversibel sein, wie im Falle des normalen Flavins, da sFl_{ox}^+ nicht durch Deprotonierung, sondern nur durch OH-Addition stabilisiert werden kann, wobei (Gl. 3) als Endprodukt das stabile Sulfoxid $\text{HsFl}_{\text{ox}}\text{-O}$ entsteht.



ZUSAMMENFASSUNG

1. Bisher nicht bekannte N(10)-Alkyl-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazine werden durch Cyclisierung von Aryl-pyrimidyl-sulfiden dargestellt, die bei der Reaktion von 2-Alkylamino-thiophenolen mit 5-Chlorpyrimidinen entstehen. Neben dem Methyl-, Allyl- und Benzylrest wird auch der "psychotrope" ω -Dimethylaminopropylrest in die 10-Stellung eingeführt.

2. Die so erhaltenen Schwefel-analogen Isoalloxazine werden von isomeren Thiaalloxazinen ^1H -NMR- und massenspektroskopisch unterschieden. IR- und UV-Spektren zeigen, daß die Titelverbindungen die 1,3H-Struktur besitzen, während andere Tautomere keinen nennenswerten Beitrag leisten.

Die langwellige Endabsorption im Elektronenspektrum wird in Bezug gesetzt zur Planarität des Tricyclus. Das Thiaflavin nimmt hierbei eine Mittelstellung zwischen Dihydroflavin und Dihydrodeazaflavin ein.

Thiaisoalloxazine werden mit einem pK von 6 N-1 deprotoniert. C(4a)-Protonierung bei eirempH -1, für die kein vergleichbarer Fall in der Flavinreihe existiert, wird NMR- und UV-spektroskopisch bewiesen.

Oxidation in saurer Lösung führt zu Radikal-Kationen. Der Einfluß der N(10)-Substituenten auf die Feinstruktur ihrer ESR-Spektren wird diskutiert.

3. Bei der basenkatalysierten elektrophilen Alkylierung liegt das unter diesen Bedingungen nicht autoxidable Thiaflavin in seiner Reaktivität zwischen den O_2 -empfindlichen 1,5-Dihydroflavin und seinem 5-Acetyl-derivat. Im System Dimethylformamid/ K_2CO_3 erfolgt ladungskontrolliert

Substitution der Positionen 1 - 4 und Grenzorbital-kontrolliert 4a- und S(5)-Angriff. Im System Chloroform/Diisopropylaminoäthan stellt S(5)-Alkylierung die ausschließliche Reaktion dar. Die Produktverteilung ist außerdem abhängig vom Alkylierungsmittel (Dimethylsulfat, Methyljodid bzw. Benzylbromid).

Der S(5)-Benzylrest wandert schon unter milden Bedingungen sigmatrop in die 4a und 4a-Position. C(4a) ist der thermodynamisch bevorzugte S Substitutionsort, wie auch die thermische Umlagerung der N(10)-Benzylverbindung bestätigt, bei der ausschließlich das C(4a)-Benzylderivat erhalten wird.

Der Datenvergleich von Thia(dihydro)flavinen und natürlichen Dihydroflavinen zeigt, daß diese beiden Systeme nicht nur formal isoelektronisch, sondern isochrom sind.

4. Die den Flavinen entsprechenden oxidierten Stufen des Thiaflavins sind Radikal und Thiazonium-Kation, deren Bildung, spektrale Eigenschaften und Stabilitäten untersucht werden.

Während das Radikal-Kation in saurer Lösung stabil ist, wird für das Neutralradikal rasche Disproportionierung nachgewiesen.

Das Thiazonium-Kation ist nur in konz. H_2SO_4 beständig und bildet in Abhängigkeit von pH und Solvens 4a-OR-Addukte bzw. Sulfoxide. 4a-Alkoxyverbindungen entstehen auch bei der Reaktion des Kation-Radikals mit Alkoholen, Sulfoxid durch Peroxid-Oxidation des reduzierten Thiaflavins.

Die Azidobasizität dieser Systeme, sowie die Kinetik ihrer Umwandlungen ineinander wird elektronenspektroskopisch belegt, wobei als instabiles Zwischenprodukt das 4a-OH-Addukt (Pseudobase) auftritt.

Die für das reduzierte Thiaflavin postulierte Analogie zu Dihydroflavinen erstreckt sich somit auch auf die Radikalstufe, nicht jedoch auf seine oxidierte Form, in welcher das formal Flavin-analoge Sulfonium-Kation irreversibel zum Sulfoxid hydrolysiert.

Daraus folgt, daß von den drei reversiblen Redox-Schritten, welche im natürlichen Flavinsystem möglich sind, im 5-S-analogen System nur die HsFl_{red} und $\text{s}\dot{\text{F}}\text{I}$ - Stufe intakt bleibt. Der Einbau von Thiaflavinen sollte daher geeignet sein, die dehydrierenden Eigenschaften des Flavin-systems auf reinen Ein-Elektronen-Transfer zu reduzieren.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Angaben

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Linström-Block ermittelt und sind nicht korrigiert.

Die Elementaranalysen wurden in der analytischen Abteilung des Pharmazeutischen Instituts der FU-Berlin durchgeführt.

Die Ermittlung der Molekülmassen erfolgte massenspektrometrisch mit einem CH 7 Varian MAT bei einer Ionisationsspannung von 70 eV.

Die IR-Spektren wurden im Perkin-Elmer-Spektralphotometer Modell 237 und 421 als KBr-Preßling gemessen. Die geschätzten Intensitäten sind mit w (schwach), m (mittel) und s (stark) angegeben.

Die Aufnahme der Elektronenspektren erfolgte in einem Varian 635 M Spektralphotometer.

Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit den Varian-Geräten A-60 A, T-60 und XL-100 unter Verwendung von Tetramethylsilan als inneren Standart aufgenommen.

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F-254 der Firma Merck verwendet. Laufstrecke: 15 bzw. 8 cm, Fließmittel: I Chloroform, Äthanol (8:2), II Benzol, Diisopropyläther, Äthanol (2:2:1), III Essigsäureäthylester, Äthanol (8:2) und IV Butanol, Eisessig, Wasser (3:1:1).

1. Darstellung von Dioxypyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazinen (Thiaflavinen)

Benzothiazolin-2-on (8), 2-Carbäthoxyaminothiophenol (7) und 2,2'-Bis-carbäthoxyaminodiphenyldisulfid (9)

20,0 g (0,16 M) 2-Aminothiophenol werden in 100 ml Äthanol gelöst und unter Argon 10,8 g (0,1 M) Chlorameisensäureäthylester hinzugetropft und 48 h auf 70 °C erhitzt. Die Lösung wird zur Trockene eingedampft und mit 300 ml Wasser versetzt, der ungelöste Rückstand mit Wasser und Benzol gewaschen und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Man erhält 10,0 g (85 %) 8 als farblose Kristalle.

Schmp: 136 °C (authent. 136 ° (63)).

Wird 1 h nach Zugabe von Chlorameisensäureester die Reaktionslösung eingedampft, mit Wasser gewaschen, in 50 ml Chloroform gelöst und mit 3 × 10 ml 1 n Na OH extrahiert, so erhält man nach dem Eindampfen der Chloroform-Lösung hellgelbe Kristalle von 9. Umkristallisation aus Äthanol/Wasser.

Schmp: 107 °C , Ausb.: 4,6 g (39 %)

$C_{18}H_{20}N_2O_4S_2$ (392,5) , MS: Molekülion m/e : 392 - 1H -NMR ($CDCl_3$, 60 MHz): δ = 1,25(t, J=7 Hz, 6H, $-CH_3$), 4,15(q, J= 7 Hz, 4H, $-CH_2-$), 6,7-7,6(m, 6H, 4,4',5,5',6 u.6'), 7,4(s, 2H, breit, NH), 8,2(dd, J_A = 9 Hz, J_B = 2 Hz, 2H, 3 u. 3') - IR ($CHCl_3$) cm^{-1} = 3420m(NH, nicht ass.), 3030m(CH), 1735s(CO), 1580s, 1520s .

Der natronalkalische Extrakt wird angesäuert und mit 3 x 30 ml Äther extrahiert. Nach Eindampfen des Äthers erhält man 7 als farbloses Öl.

Bei der Destillation von 7 wird z. T., entsprechend Lit. ⁽⁶³⁾, 8 gebildet, das im Kühler kondensiert.

Sdp.: 114 °C-0,1 Torr, Ausb.: 5,8 g (49,3 %)

$C_9H_{11}NO_2S$ (197,3), MS: Molekülion m/e: 197 - 1H -NMR ($CDCl_3$, 60 MHz) δ = 1,3(t, J = 7 Hz, 3H, $-CH_3$), 3,07(s, 1H, SH), 4,25(t, J = 7 Hz, 2H, $-CH_2-$), 6,75-7,1(m, 3H, 4,5 u. 6), 7,4(s, 1H, breit, NH), 8,05(dd, J_A = 9 Hz, J_B = 2 Hz, 1H, 3). - IR($CHCl_3$) cm^{-1} = 3410m(NH, nicht ass.), 3020m(CH), 2590w(SH), 1735s(CO), 1585s, 1520s.

3-(2'-Benzothiazolyl)-benzothiazolin-2-on (11)

Entgegen der Literaturangabe ⁽⁶³⁾ entsteht bei 12 stündigem rückfließenden Erhitzen von 2-Chlorbenzothiazol (10) in Äthanol nur in untergeordnetem Maße (ca. 5 %) 8, sondern zum größten Teil 11.

Schmp: 152 °C (aus Äthanol), Ausb.: (90 %)

$C_{14}H_8N_2OS_2$ (284,3), MS: Molekülion m/e = 284 - 1H -NMR ($CDCl_3$, 60 MHz) δ = 7,1-8,1(m, 7H, arom.), 9,0-9,2(m, 1H, 4). - IR ($CHCl_3$) cm^{-1} = 3150w, 3100w, 3050w(CH), 1680s(CO), 1590m, 1510s.

2-Acetylaminophenyl-alkyl-sulfide (5) und 2-Aminophenyl-alkyl-sulfide (6)

1 mMol 2,2'-Bis-acetamino-diphenyl-disulfid (4) wird mit 10 mMol K_2CO_3

in 100 ml Aceton suspendiert und 5 mMol Alkylierungsmittel (Methyljodid bzw. -Dimethylaminopropylchlorid) in 20 ml Aceton hinzugetropft und 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert und eingedampft. Nach Zugabe von 5 ml Äther kristallisiert 5b aus, während 5e in Lösung geht.

2-Acetaminophenyl-methyl-sulfid (5b)

Schmp: 103°C , (authent. $(103)^{\circ}\text{C}$) = $102-103^{\circ}\text{C}$)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz) δ = 2,2(s, 3H, CO-CH_3), 2,4(s, 3H, SCH_3), 6,9-7,6(m, 3H, 4,5 u. 6), 8,2(s, 1H, breit, NH), 8,1-8,4(m, 1H, 3), -

2-Acetaminophenyl-1(3'-dimethylaminopropyl)-sulfid (5e),

die ätherische Lösung wird eingeeengt und destilliert, bzw. mit konz. HCl das Hydrochlorid gefällt.

Sdp.: $140^{\circ}\text{C}-0,01\text{ Torr}$, Schmp: (HCl-Salz) 101°C (authent. $(104)^{\circ}\text{C}$) $\neq 102^{\circ}\text{C}$)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz) δ = 1,7(m, 2H, $\text{C-CH}_2\text{-C}$), 2,1(s, 6H, $\text{N(CH}_3)_2$), 2,35(t, $J = 7\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2,75(t, $J = 7\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 6,8-7,6(m, 3H, 4,5 u. 6), 8,2-8,45(dd; $J_{\text{A}} = 9\text{ Hz}$, $J_{\text{B}} = 2\text{ Hz}$, 1H, 3), 8,4(s, 1H, breit, NH) .

1/2-stündiges Erhitzen von 5b und 5e in konz. HCl liefert 6b und 6e, die durch Extraktion mit Äther aus der neutralen Lösung gewonnen werden können.

2-Aminophenyl-methyl-sulfid (6b)

Sdp.: $125^{\circ}\text{C}-11\text{ Torr}$ (authent. $(103)^{\circ}\text{C}$) = $133-134^{\circ}\text{C}-15\text{ Torr}$)

2-Aminophenyl-1(3'-dimethylaminopropyl)-sulfid (6e)

Sdp.: 83 °C-0,1 Torr

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz) δ = 1,8(m, 2H, C-CH₂-C), 2,2(s, 6H, N(CH₃)₂), 2,35(t, J= 7 Hz, 2H, -CH₂-N), 2,8(t, J= 7 Hz, 2H, -CH₂-S), 4,4(s, 2H, NH₂), 6,5-7,5(m, 4H, arom.).

Alkylierung von 8 zu 3-Alkyl-benzothiazolin-2-onen (12)

Allgemeine Vorschrift: 0,1 Mol 8 werden in 200 ml Dimethylformamid gelöst und 0,5 Mol K₂CO₃ hinzugegeben. 0,3 Mol Alkylierungsmittel (Methyljodid, Benzylchlorid, Allylbromid oder 3-Dimethylaminopropylchlorid) werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst langsam zugetropft und 5 h bei ca. 50 °C gerührt. Nach Eindampfen der Lösung wird in 100 ml Äther aufgenommen und man erhält nach Eindampfen des Lösungsmittels 12b-e, deren physikalische Konstanten mit den Literaturdaten (61, 105) übereinstimmen.

3-Methyl-benzothiazolin-2-on (12b)

C₈H₇NOS (165,2), Schmp: 74 °C (Petroläther)

3-Benzyl-benzothiazolin-2-on (12c)

C₁₄H₁₂NOS (242,3), Schmp: 57 °C (Äther), Sdp.: 190 °C- 0,1 Torr

3-Allyl-benzothiazolin-2-on (12d)

C₁₀H₉NOS (191,2), Sdp.: 135 °C-1 Torr

3-(3'-Dimethylaminopropyl)-benzothiazolin-2-on (12e)

C₁₂H₁₆N₂OS (236,3), Sdp.: 132 °C-0,05 Torr

Hydrolyse von 12 zu N-Alkylaminothiophenolen (13) verläuft nach ^(60,61) durch 5-stündiges Erhitzen in KOH/Äthanol 90 %ig unter Rückfluß. Die Thiophenole 13 werden mit Äther aus der sauren wäßrigen Lösung ausgeschüttelt. Bei Verbindung 13e muß dabei ein pH von 6,5 bis 8 eingehalten werden. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels werden die Produkte 13 sofort weiterverarbeitet, da sie bei stehen an der Luft oxidativ zu 14 dimerisieren.

5-Chlor-2,4,6-(1H,3H,5H)-pyrimidintrione (16)

Allgemeine Vorschrift: Man löst 4 mMol Barbitursäure in 50 ml Wasser und erhitzt auf 70 °C. Dazu tropft man langsam 6 mMol Sulfurylchlorid und erhitzt die Lösung kurz zum Sieden. Der nach dem Abkühlen gebildete Niederschlag wird gesammelt und aus der 20-fachen Menge Wasser umkristallisiert. Ausbeuten ca. 85 %.

Die physikalischen Konstanten stimmen mit den Literaturdaten ⁽¹⁰⁶⁾ überein.

5-Chlor-2,4,6-(1H,3H,5H)-pyrimidintrion (16, $R^2=R^3=H$)

$C_4H_3ClN_2O_3$ (162,5) , Schmp: 280-290 °C

5-Chlor-1-methyl-2,4,6-(3H,5H)-pyrimidintrion (16, $R^2=H$ $R^3=CH_3$)

$C_5H_5ClN_2O_3$ (176,6) , Schmp: 136 °C

5-Chlor-1,3-dimethyl-2,4,6-(5H)-pyrimidintrion (16, $R^2=R^3=CH_3$)

$C_6H_7ClN_2O_3$ (190,6) , Schmp: 130 °C

Führt man die Reaktion unter den gleichen Bedingungen, jedoch bei 20 °C

durch, so fällt unmittelbar nach Zugabe von Sulfurylchlorid 5,5-Dichlorbarbitursäure (17) aus. z. B.

5,5-Dichlor-1,3-dimethyl-2,4,6-pyrimidintrion (17, $R^2=R^3=CH_3$)

$C_6H_6Cl_2N_2O_3$ (225,0) , Schmp: 156 °C (authent. (106, 107) = 157 °C)

Darstellung der Aryl-pyrimidyl-sulfide (19)

Allgemeine Vorschrift: 1 mMol 5-Chlorbarbitursäure 16 wird in 75 ml Äthanol mit 7 mMol Triäthylamin unter Argon zum Sieden erhitzt, so daß eine klare Lösung entsteht. Dazu tropft man 1 mMol Thiophenol 13 in 10 %iger äthanolischer Lösung und erhitzt eine Stunde zum Sieden. Im Falle der 1,3-unsubstituierten Verbindungen fallen die Triäthylammoniumsalze 18 aus der noch heißen Reaktionslösung aus, bei 1,3-substituierten Verbindungen wird die klare Lösung zur Trockene eingedampft und mit 50 ml Wasser versetzt. Nach Zugabe von Säure fallen die Produkte 19 als weiße Niederschläge aus. Die Reinigung erfolgt durch Umfällen mit NaOH aus wässriger Lösung. Ergebnisse in Tabelle 6 .

2(Aminophenyl)-5[2,4,6-(1H,3H,5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19a)

Ausb.: 75 % , Schmp: 320 °C (Wasser, NaOH)

2(Aminophenyl)-5[1,3-dimethyl-2,4,6-(5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19b)

Ausb.: 68 % , Schmp: 202 °C (Wasser, NaOH)

2(Methylaminophenyl)-5[2,4,6-(1H,3H,5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19c)

Ausb.: 72 % , Schmp: 208 °C (Wasser, NaOH)

Tabelle: 6

19	Summenformel Mol/Masse	Analyse C H N	¹ H - NMR in DMSO d ₆ δ:
a	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₃ S 251,26 H ₂ O: C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₄ S 269,28	Ber: (+ 1H ₂ O): 44,61 4,12 15,61 Gef: 44,09 4,08 15,62	10,0 (s 2H; N-1 und N-3 H) 8,2-7,3 (m 5H; -NH ₂ ⁺ , H ₂ O) 7,8-7,0 (m 4H; arom. H)
b	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₃ S 279,3	Ber: 51,59 4,69 15,04 Gef: 50,94 4,72 14,84	7,9-7,4 (s 6H; -NH ₂ ⁺ , H ₂ O) 7,8-7,1 (m 4H; arom. H) 3,1 (s 6H; N-1 und N-3)
c	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃ S 265,29	Ber: 49,80 4,18 15,85 Gef: 49,11 4,23 16,29	10,8-10,0 (s 2H; N-1 und N-3) 8,1-7,5 (s 2H; -NH ₂ ⁺ -R) 8,1-7,4 (m 4H; arom. H) 2,97 (s 3H; -N-CH ₃)
d	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₃ S 279,3	Ber: 51,59 4,69 15,04 Gef: 50,92 4,79 14,61	10,5 (s 1H; N-1) 8,15-7,5 (s 2H; -NH ₂ ⁺ -R) 7,8-6,9 (m 4H; arom. H) 3,07 (s 3H; N-1 CH ₃) 2,98 (s 3H; -NH ₂ ⁺ -CH ₃)
e	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃ S 293,34	Ber: 53,3 5,16 14,33 Gef: 52,68 5,14 14,14	8,8-8,2 (s 2H; -NH ₂ ⁺ -R) 7,85-7,15 (m 4H; arom. H) 3,12 (s 6H; N-1 und N-3 CH ₃) 3,05 (s 3H; -NH ₂ ⁺ -CH ₃)
f	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃ S 355,4	Ber: 60,83 4,82 11,82 Gef: 60,79 4,79 11,78	11,35-10,4 (1H; N-1 H) 7,8-6,6 (m, 12H; arom. H u. -NH ₂ ⁺) 4,48 (s, 2H; -CH ₂ -) 3,10 (s, 3H; -CH ₃).
g	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₃ S 305,34	Ber: 55,06 4,95 13,76 Gef: 54,15 4,98 13,82	11,3-10,0 (1H; N-1 H) 7,7-6,7 (m 4H; arom. H) 6,6-6,3 (cm 3H; -NH ₂ ⁺ , H ₂ O) 6,2-5,1 (m 3H; vinyl) 3,9 (d, H _{AB} , 2H-CH ₂ -) 3,05 (s, 3H; -CH ₃)
h	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₄ O ₃ S 372,9	Ber. 48.30 5.41 15.03 Gef. 47.73 5.37 15.11	9.5 (s, 2H; N(1,3)H) 8.0-6.5 (m, 4H; arom. H) 4.0 (s, 2H; breit, NH ₂ ⁺) 3.2 (m, 2H; HN-CH ₂ -) 2.35 (m, 2H; -CH ₂ -N(CH ₃) ₂) 2.3 (s, 6H; N(CH ₃) ₂) 2.0 (m, 2H; C-CH ₂ -C)

2(Methylaminophenyl)-5[1-methyl-2,4,6-(3H,5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19d)

Ausb.: 70 % , Schmp: 185 °C (Wasser, NaOH)

2(Methylaminophenyl)-5[1,3-dimethyl-2,4,6-(5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19e)

Ausb.: 60 % , Schmp: 198 °C (Methanol)

2(Benzylaminophenyl)-5[1-methyl-2,4,6-(3H,5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19f)

Ausb.: 65 % , Schmp: 169 °C (Methanol)

2(Allylaminophenyl)-5[1-methyl-2,4,6-(3H,5H)-trioxypyrimidyl]-sulfid (19g)

Ausb.: 63 % , Schmp: 151 °C (Methanol)

2(ω-Dimethylaminopropyl-aminophenyl)-5[2,4,6-(1H,3H,5H)-trioxo-pyrimidyl]-sulfid (19h) wird abweichend von der allgemeinen Vorschrift erhalten: 10mMol 16 (R = H) werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und auf 60 °C erhitzt. Zu dieser Lösung tropft man 10mMol 13e langsam zu, rührt 2 h weiter und läßt abkühlen. Die abgeschiedenen weißen Kristalle werden gesammelt und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausb.: 60 % , Schmp:(HCl-Salz) 227 °C (Äthanol)

Cyclisierung von 19 zu 2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazinen (20)

Allgemeine Vorschrift: 10 mMol 19 werden in 75 ml 0,6 n äthanolischer HCl 3 h unter Argon-Atmosphäre rückfließend erhitzt. Die Produkte 20 kristallisieren beim Erkalten aus der Reaktionslösung aus. Im Falle der höher substituierten Verbindungen 20d-h engt man die Lösung auf ein Vier-

tel ihres Volumens ein. Durch Umfällen aus NaOH bzw. Umkristallisation aus Dimethylformamid oder Methanol lassen sich 20a-h reinigen.

Verbindung 20e ist nach obigem Verfahren nicht darstellbar. Sie entsteht durch 24 stündiges rückfließendes Erhitzen von 10 mMol 19e in Xylol in Gegenwart von 50 mg p-Toluolsulfonsäure am Wasserabscheider. Man engt die Lösung bis zur Trockene ein, wäscht den Rückstand mit 0,1 n NaOH und extrahiert mit 30 ml Äther. Die Ätherphase schüttelt man drei Mal mit 10 ml 3 n HCl und dampft zur Trockene ein. Der Rückstand wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Man erhält 20e in etwa 10 %iger Ausbeute.

Ergebnisse in Tabelle 1 (Seite 27, NMR- und IR-Daten) und 7.

2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20a)

1,3-Dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyrimido[5,4-b][1,4]-benzothiazin (20b)

10-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20c)

3,10-Dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20d)

1,3,10-Trimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20e)

10-Benzyl-3-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20f)

Tabelle 7a

20	R ₁	R ₂	R ₃	Kristalle aus: Schmp., Ausbeute	Summenformel Mol.-Masse	Analyse		
						C	H	N
a	H	H	H	H ₂ O/NaOH >360° 90 %	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₂ S 233,3	Ber: 51,49 Gef: 51,37	3,02 3,10	18,02 17,96
b	H	CH ₃	CH ₃	MeOH/H ₂ O 260° 70 %	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂ S 261,3	Ber: 55,16 Gef: 54,86	4,24 4,24	16,09 16,02
c	CH ₃	H	H	DMF 325° 85 %	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₂ S 247,27	Ber: 53,43 Gef: 53,21	3,67 3,71	17,00 17,01
d	CH ₃	H	CH ₃	EtOH/H ₂ O 318° 75 %	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂ S 261,3	Ber: 55,16 Gef: 55,11	4,24 4,69	16,09 15,55
e	CH ₃	CH ₃	CH ₃	EtOH 185° ~ 10 %	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₂ S 275,32	Ber: 56,71 Gef: 56,66	4,76 4,82	15,27 15,34
f	Bz ¹⁾	H	CH ₃	EtOH 221° 70 %	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₂ S 337,40	Ber: 64,08 Gef: 63,79	4,48 4,58	12,45 12,37
g	Allyl	H	CH ₃	EtOH 201° 78 %	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₂ S 287,34	Ber: 58,52 Gef: 58,48	4,56 4,53	14,62 14,62
h	DMAP ²⁾	H	H	EtOH/H ₂ O 185° 55 %	C ₁₅ H ₁₉ ClN ₄ O ₂ S 354,85	Ber: 50,77 Gef: 49,90	5,11 5,13	15,79 15,51

1. Bz = Benzyl

2. DMAP = ω-Dimethylaminopropyl

Tabelle 7b

20	Lösungsmittel	UV - Absorptionen $\lambda_{\max}$ (log ϵ)	Molekülart ⁺
a	MeOH/DMF 385s(3,08); 324 (3,32); 278 (3,91); 253 (4,31); O, 1N NaOH 320s(3,45); 278s(3,91); 12N HCl 368 (3,28); 285 (3,68);		O - +
b	MeOH 380s(3,00); 325s(3,30); 281 (3,86); 249 (4,31); O, 1N NaOH 320s(3,58); 281s(3,95); 262 (4,04); 233s(4,19) 12N HCl 376 (3,41); 293 (3,78); 254 (4,25);		O - +
c	MeOH 360s(3,25); 281 (3,95); 248 (4,26); O, 1N NaOH 320s(3,36); 280s(3,91); 255 (4,33); 6N NaOH 315s(3,40); 278s(3,85); 249 (4,27); 12N HCl 374 (3,53); 291 (3,83); 251 (4,21);		O - - +
d	MeOH 360s(3,15); 281 (3,93); 250 (4,24); O, 1N NaOH 320s(3,43); 281s(3,93); 256 (4,37); 12 N HCl 369 (3,45); 291 (3,80); 249 (4,16);		O - +
e	MeOH 350s(3,38); 287 (3,98); 249 (4,32); 219 (4,28) 12N HCl 366 (3,51); 291 (3,84); 251 (4,23);		O +
f	MeOH 340s(3,34); 282 (4,05); 248 (4,31); O, 1N NaOH 325s(3,45); 283s(4,04); 258 (4,45); 12N HCl 372 (3,45); 289 (3,89); 251 (4,31);		O - +
g	MeOH 355s(3,23); 282 (4,00); 248 (4,27); 218 (4,23) O, 1N NaOH 325s(3,30); 281s(3,92); 259 (4,32); 12N HCl 368 (3,49); 291 (3,90); 250 (4,23);		O - +
h	MeOH 360s(3,20) 281 (3,92); 250 (4,27) O, 1N NaOH 320s(3,39); 281s(3,94); 254 (4,35) 12 N HCl 370 (3,42) 292 (3,81)		O - +

+ O = Neutralkörper

- = Anion

+ = Kation

10-Allyl-3-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]-benzothiazin (20g)

10(3'-Dimethylaminopropyl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (20h).

2. Alkylierung der Thiaflavine 20c und 20d

Methylierung in Dimethylformamid

10 mMol 20c werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und mit 5 g wasserfreiem K_2CO_3 versetzt. Zu dieser Suspension tropft man 50 mMol Alkylierungsmittel (Methyljodid bzw. Dimethylsulfat) in 10 %iger Dimethylformamid-Lösung und rührt bei Zimmertemperatur. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung in Fließmittel II zeigt nach 10 Minuten vollständige Umsetzung zu zwei Produkten im Falle der Alkylierung mit Dimethylsulfat und drei Produkte bei der Methylierung mit Methyljodid.

Man gibt die Reaktionslösung auf 200 ml Eis und wäscht den Niederschlag mit 0,1 n NaOH und Wasser. Der Rückstand enthält die Produkte 23 und 24, im Filtrat ist nur 23 nachweisbar. Durch Extraktion des Rückstandes mit 3 · 20 ml Petroläther lassen sich 23 und 24 voneinander trennen. 24 ist im Gegensatz zu 23 Petroläther-löslich. Aus dem Filtrat kann man zusätzlich 23 mit Äther extrahieren. Durch Umkristallisation aus Äthanol erhält man 23 als intensiv gelbe und 24 als farblose Kristalle.

2-Methoxy-3,10-dimethyl-4-oxo-3,4-dihydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (23)

Ausb.: 65 %

2,4-Dimethoxy-10-methyl-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (24)

Ausb.: 20 %

Bei der Methylierung mit Methyljodid gewinnt man aus dem Ätherauszug des wässrigen Filtrats zusammen mit 23 Verbindung 20e. Deren Trennung gelingt durch fraktionierte Kristallisation aus Äther/Petroläther oder durch präparative Dickschichtchromatographie (Fließmittel: Äther/Petroläther 8:2). Ausbeute an 20e. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit der durch Direktsynthese gewonnenen Substanz.

Methylierung in Chloroform

10 mMol 20d werden in 100 ml Chloroform gelöst und mit 0,1 Mol Diisopropylaminoäthan versetzt, wobei eine klare, hellgelbe Lösung entsteht. Dazu werden 0,2 Mol Methyljodid getropft und bei Zimmertemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographisch wird vollständige Umsetzung nach 10 Minuten Reaktionszeit nachgewiesen. Das Lösungsmittel wird abgezogen, 50 ml Wasser zugegeben, mit NaOH auf pH 10 eingestellt und die Lösung drei Mal mit 20 ml Äther extrahiert. Das wässrige Filtrat wird anschließend fünf Mal mit 50 ml Chloroform ausgezogen, die Chloroform-Phase zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert.

Man erhält farblose Kristalle der Verbindung 25 .

3,5,10-Trimethyl-2,4-dioxo-2,3-dihydro-pyrimido[5,4-b] [1,4] benzo-thiazin (25)

Ausb. : 85 %

Benzylisierung in Dimethylformamid

a) mit Benzylchlorid:

10 mMol 20c werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und mit 5 g wasserfreiem K_2CO_3 suspendiert. Dazu läßt man 50 mMol Benzylchlorid zutropfen und erwärmt die Lösung auf 60 °C. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigt nach 5 h vollständige Umsetzung zu drei Produkten. Man dampft die Reaktionslösung bei 0,01 Torr auf dem siedenden Wasserbad zur Trockene ein und versetzt den Rückstand mit 25 ml warmen Äther, aus dem sich nach dem Abkühlen 30 rein abscheidet. Umkristallisation aus Äthanol.

Das Filtrat wird zur Hälfte eingeengt. Dabei fällt 32b zusammen mit wenig 30 aus, das sich durch Kristallisation aus Petroläther rein isolieren und umkristallisieren läßt.

Als letzte Fraktion erhält man aus obigem Filtrat 29 zusammen mit wenig 32b, deren Trennung durch Umkristallisation aus Äthanol gelingt.

2,4-Dibenzoxy-10-methyl-pyrimido[5,4-b] [1,4] benzothiazin (29)

Ausbeute : 15 %

2-Benzoxo-3-benzyl-10-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-pyrimido[5,4-b] [1,4]-benzothiazin (30)

Ausb.: 35 %

3,4a-Dibenzyl-10-methyl-2,4-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-pyrimido[5,4-b] [1,4]benzothiazin (32b)

Ausb.: 40 %

b) mit Benzylbromid

Zu 10 mMol 20d in 50 ml Dimethylformamid und 5 g K_2CO_3 suspendiert, werden 50 mMol Benzylbromid gegeben. Vollständige Umsetzung erfolgt bei Zimmertemperatur nach 1/2 h. Die Reaktionslösung wird auf 200 ml Wasser gegeben und mit drei Mal 50 ml Äther extrahiert. Die Äther-Phase wird bei 0,01 Torr bei 100 °C zur Trockene eingedampft und man erhält beim Behandeln des Rückstandes mit wenig Petroläther weiße Kristalle der Verbindung 32a.

Das wässrige Filtrat wird drei Mal mit 50 ml Chloroform extrahiert und die Chloroform-Phase bei 0,01 Torr bei 40 °C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit Methanol umkristallisiert und liefert farblose Kristalle der Verbindung 31.

Erhöht man die Reaktionszeit auf 12 h, so ist dünnschichtchromatographisch 31 nicht mehr nachweisbar zugunsten einer weiteren Verbindung. Die Reaktionslösung wird filtriert, im Vacuum zur Trockene eingeeengt und mit 10 ml Methanol versetzt. Als Rückstand bleibt 33a, das aus Methanol umkristallisiert, intensiv gelbe Kristalle gibt.

4a-Benzyl-3,10-dimethyl-2,4-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-pyrimido[5,4-b]
[1,4]benzothiazin (32a)

Ausb. : 60 %

5-Benzyl-3,10-dimethyl-2,4-dioxo-2,3-dihydro-pyrimido[5,4-b] [1,4]-
benzothiazin (31)

Ausb. : 35 %

4-Benzoxo-3,10-dimethyl-2-oxo-2,3-dihydro-pyrimido[5,4-b] [1,4] benzo-
thiazin (33a)

Ausb. : 25%

Benzylisierung in Chloroform

10 mMol 20d geben in 100 ml Chloroform mit 50 mMol Diisopropylamino-
äthan eine klare, hellgelbe Lösung, zu der 50 mMol Benzylbromid zuge-
tropft werden. Vollständige Umsetzung erfolgt nach 10 Minuten. Die Re-
aktionslösung wird mit zwei Mal 50 ml 0,1 n HCl extrahiert, das Chloroform-
Filtrat eingengt (0,01 Torr, 50 °C) und der Rückstand mit Petroläther
kristallisiert. Nach Umkristallisation aus Methanol erhält man 33a.

Der HCl-Extrakt wird auf pH 9 eingestellt und drei Mal mit 30 ml Äther
extrahiert, anschließend noch einmal mit 50 ml Chloroform. Die Chloro-
form-Phase wird eingengt und der Rückstand mit Methanol umkristalli-
siert, farblose Kristalle von 31a .

Ausbeuten: 33a (35 %), 31a (65 %).

Ergebnisse in Tabellen 2, 4 und 8.

Tabelle 8

	Ort der Alkylierung	Schmp. krist. aus	Summenformel Mol.-Masse	Elementaranalyse C H N	IR (cm ⁻¹) Carbonylabsorptionen
23	2α-CH ₃ 3 -CH ₃ 10 -CH ₃	208° Äthanol	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₂ S 275.3	Ber. 56.71 4.76 15.27 Gef. 56.71 4.78 15.22	1640 s
30	2α-Benzyl 3 -Benzyl 10 -CH ₃	172° Äthanol	C ₂₅ H ₂₁ N ₃ O ₂ S 427.5	Ber. 70.23 5.07 9.83 Gef. 69.91 5.05 9.67	1640 s
33	3 -CH ₃ 4α-Benzyl 10 -CH ₃	215° Methanol	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₂ S 351.4	Ber. 64.93 4.88 11.96 Gef. 64.81 4.86 11.92	1665 s
24	2α-CH ₃ 4α-CH ₃ 10 -CH ₃	89° Äthanol	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₂ S 275.3	Ber. 56.71 4.76 15.27 Gef. 56.90 4.93 15.03	-
29	2α-Benzyl 4α-Benzyl 10 -CH ₃	116° Äthanol	C ₂₅ H ₂₁ N ₃ O ₂ S 427.5	Ber. 70.23 5.07 9.83 Gef. 69.94 5.05 9.74	-
32a	3 -CH ₃ 4α-Benzyl 10 -CH ₃	136° PAe	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₂ S 351.4	Ber. 64.93 4.88 11.96 Gef. 65.21 4.85 11.99	1715 w, 1670 s
32b	3 -Benzyl 4α-Benzyl 10 -CH ₃	125° Pte	C ₂₅ H ₂₁ N ₃ O ₂ S 427.5	Ber. 70.32 5.07 9.83 Gef. 70.22 5.14 9.82	1700 m, 1650 s
25	3 -CH ₃ 5 -CH ₃ 10 -CH ₃	205° Methanol	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₂ S 275.3	Ber. 56.71 4.76 15.27 Gef. 56.78 4.83 15.38	1660 s
31	3 -CH ₃ 5 -Benzyl 10 -CH ₃	175° Methanol	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₂ S 351.4	Ber. 64.93 4.88 11.96 Gef. 64.64 4.83 11.89	1665 s

Umlagerungen von Alkylthiaflavinen

a) 3,5,10-Trimethylverbindung 25

100 mg 25 werden im Schmelzröhrchen im Ölbad 10 Minuten auf 200 °C erhitzt. Die farblosen Kristalle nehmen dabei eine intensiv gelbe Farbe an.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigt die Bildung dreier Produkte zu ungefähr gleichen Teilen an. Eine Verbindung wird durch Vergleich mit authentischer Substanz als 20e identifiziert. Den beiden anderen Produkten wird aufgrund des ¹H-NMR-Spektrums des Umlagerungsgemisches die 4a- und 4-Methylstruktur 26 und 27 zugeordnet.

3,4a,10-Trimethyl-2,4-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-pyrimido[5,4-b] [1,4]-benzothiazin (26)

Ausb.: ca. 33 % , Schmp: 93 -95 °C

C₁₃H₁₃N₃O₂S (275,3) , MS: (Molekülion) 275 m/e - ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz) δ = 1,62(s, 4a-CH₃), 3,4(s, 3-CH₃), 3,75(s, 10-CH₃), 6,7 - 7,4 (m, arom.H) - UV/VIS: $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 330s(3,63), 301(3,81)$.

4-Methoxy-3,10-dimethyl-2-oxo-2,3-dihydro-pyrimido[5,4-b] [1,4]benzothiazin (27)

Ausb.: ca. 33 % , Schmp: 203 - 206 °C

C₁₃H₁₃N₃O₂S (275,3) , MS: (Molekülion) m/e = 275 - ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz) δ = 3,4(s, 3-CH₃ u. 10-CH₃), 4,05(s, 4-CH₃), 6,7 - 7,4(m, arom. H).

b) 5-Benzyl-3,10-dimethyl-verbindung (31a)

10 mMol 31a werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und in Gegenwart von 1 g K_2CO_3 12 h gerührt. Es entstehen zwei Produkte. Die Aufarbeitung erfolgt analog der Benzilylierung mit Benzylbromid bei 12 h Reaktionszeit (Seite 110). Man erhält die Produkte 32a und 33a, welche durch Vergleich mit den authentischen Substanzen identifiziert werden.

Ausb.: 32a (60 %) , 33a (40 %)

c) 10-Benzyl-3-methyl-verbindung (20f)

50 mg 20f werden in 0,5 ml $DMSO-d_6$ gelöst und im Ölbad auf 150 °C erhitzt. Das Verschwinden des Singulets bei 5,2 ppm im 1H -NMR Spektrum zeigt vollständige Umsetzung nach 1 h an. Der entstandenen Verbindung wird aufgrund des NMR-Spektrums die 4a-Benzylstruktur zugeordnet.

4a-Benzyl-3-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4,5-pentahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (34)

Ausb.: 95 %

1H -NMR ($DMSO-d_6$, 60 MHz) δ = 3,1 und 3,3(d, J = 14 Hz, 4a- CH_2), 3,2(s, 3- CH_3), 6,8 - 7,6(m, 9H, arom.H), 10,0 - 10,5(s, breit, NH).

3. Darstellung der oxidierten Thiaflavine

Radikal-Kation (35)

Die Darstellung der Radikal-Kationen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Trifluoressigsäure. Eine mmolare Lösung von 20d in TFE wird mit der gleichen Menge einer 0,5 mmolaren Lösung Dibenzoylperoxid in TFE versetzt. Das so entstandene Radikalkation 35 ist in Lösung unter Lichtabschluß unbegrenzt stabil.

UV/VIS: Abb.: 13 (Seite 68) - ESR: Abb.: 9 (Seite 38) und Abb.: 10 .

Radikal-Kation-Bromid (35)

Zu 10 mMol einer gesättigten Lösung von 20d in Eisessig (etwa 50 ml) werden etwa 10 mMol Brom getropft. Es entsteht ein violetter Niederschlag, der abgesaugt und mit Äther gewaschen wird. Die Kristalle müssen dann sofort bei 80 °C und 0,1 Torr getrocknet werden, da sie stark hygroskopisch sind. Man erhält 2,2 g Radikal-Bromid.

Ausb.: 45 % , Schmp:162 °C

$C_{12}H_{11}BrN_3O_2S$ Br_2 (501,0) Ber: C 28,76 H 2,21 N 8,40

Gef: C 28,29 H 2,16 N 8,23

UV/VIS und ESR (s. o.) - IR (KBr) cm^{-1} = 3420s(NH), 3080w, 2950w, 2920w, 2850w(CH), 1710s, 1685s, 1650w(CO), 1620s, 1455s.

Neutralradikal (38)

Eine 0,1 molare Lösung von 20d in Trifluoressigsäure wird mit der gleichen Menge einer 0,05 molaren Lösung Dibenzooylperoxid versetzt. Die entstehende Lösung von 35 in TFE wird fast zur Trockene eingedampft (bei Zimmertemperatur im Vacuum) und mit der 100-fachen Menge des ursprünglichen Volumens Chloroform versetzt. Die Lösung nimmt dabei eine hellgrüne Farbe an. 38 ist Elektronen- und ESR-spektroskopisch aus dieser Lösung nachweisbar.

UV/VIS : Abb.: 17 (Seite 76) - ESR : Abb.: 15 (Seite 74)

Ebenso wird das Neutralradikal 39 erhalten.

UV/VIS und ESR (s. o.)

3,10-Dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin-sulfoxid

10 mMol 20d werden in 50 ml Aceton suspendiert und 20 mMol wässriges H_2O_2 (30 %ig) zugegeben. Der nach 30 Minuten gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und aus NaOH/Wasser umgefällt. Man erhält 2,4 g 40.

Ausb.: 92 % , Schmp: 192 °C

$C_{12}H_{11}N_3O_3S$ (277,3)

Ber: C 51,97 H 3,99 N 15,15

Gef: C 51,73 H 3,99 N 15,24

MS: (Molekülion) $m/e = 277$ - $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 60 MHz) $\delta = 3,3(\text{s}, 3\text{H}, 3\text{-CH}_3)$, $3,78(\text{s}, 3\text{H}, 10\text{-CH}_3)$, $7,25 - 8,2(\text{m}, 4\text{H}, 6,7,8 \text{ u. } 9)$, $10,5 - 11,0(\text{s}, 1\text{H}, \text{breit}, \text{NH})$ - IR (KBr) $\text{cm}^{-1} = 3430(\text{m(NH)})$, $3190 - 3060(\text{w(CH)})$, $2950(\text{w})$, $2920(\text{w})$, $2850(\text{w(CH)})$, $1715(\text{s})$, $1690(\text{s})$, $1645(\text{s(CO)})$, $1630(\text{s})$. - UV/VIS : Abb. 18 (Seite 82)

4a-Methoxy-3,10-dimethyl-2,4-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin (41)

10 mMol 35 (als Radikalbromid) werden in 50 ml Methanol gegeben und 2 h gerührt. Die Lösung nimmt erst eine grüne Farbe an, wird dann farblos und es entsteht ein Niederschlag, der abgesaugt wird. Man erhält 2,1 g 41.

Ausb.: 72 % , Schmp: 164°C (Methanol)

$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (291,3) Ber: C 53,59 H 4,49 N 14,42
Gef: C 53,35 H 4,47 N 14,45

MS: (Molekülion) $m/e = 291$ - $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz) $\delta = 3,28(\text{s}, 3\text{H}, 3\text{-CH}_3)$, $3,34(\text{s}, 3\text{H}, 10\text{-CH}_3)$, $3,85(\text{s}, 3\text{H}, \text{OCH}_3)$, $7,1 - 7,6(\text{m}, 4\text{H}, \text{arom.H})$ - IR (KBr) $\text{cm}^{-1} = 2990(\text{w})$, $2940(\text{w(CH)})$, $1710(\text{m})$, $1660(\text{s(CO)})$, $1580(\text{s})$, $1550(\text{s})$. UV/VIS : Abb. 19 (Seite 84).

Thiazonium-Kation 42

42 ist nicht isolierbar. Es wird erhalten durch Auflösen von 40 bzw. 41

in konz. H_2SO_4 , wobei die Konzentrationen bis zu 1 Molar sein können.

Die Selbstreduktionsrate von 42 nimmt mit fallender Konzentration zu.

3,10-Dimethyl-2,3,4-trihydro-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazonium-Kation (42).

Ausb.: 100 % (in konz. H_2SO_4)

UV/VIS : Abb. 20 (Seite 87)

LITERATURVERZEICHNIS

1. H.H.Fall, H.G.Petering J. Am. Chem. Soc.
78, 377 (1956)
2. R.R.Adams, C.A.Weisel J. Am. Chem. Soc.
H.S.Mosher 68, 883 (1946)
3. R.D.Faulkner, J.P.Lambooy J. Med. Chem.
6, 292 (1963)
4. J.P.Lambooy, H.V.Aposhian J. Nutr.
47, 539 (1952)
5. R.Kuhn, P.Desnuelle, Chem. Ber.
F.Weygand 70, 1293 (1937)
6. F.Weygand, R.Löwenfeld, Chem. Ber.
E.F.Möller 84, 101 (1951)
7. F.E.King, R.M.Acheson J. Chem. Soc.
1946, 681
8. H.Hippchen Chem. Ber.
80, 263 (1947)
9. F.Kipnis, N.Weiner, J. Am. Chem. Soc.
P.E.Spoerri 69, 799 (1947)
10. A.Burkett J. Am. Chem. Soc.
69, 2555 (1947)
11. R.B.Barlow, H.R.Ing J. Chem. Soc.
1950, 713
12. J.J.Dombrowski, J.P.Lambooy Arch. Biochem. Biophys.
159, 378 (1973)
13. V.M.Berezowskii, Zh. Obschek. Khim.
L.M. Melnikova 31, 3827 (1961)
14. F.Müller, P.Hemmerich Helv. Chim. Acta
49, 2352 (1966)

15. D.E.O'Brien, L.T.Weinstock, J. Heterocycl. Chem.
C.Cheng 7, 99 (1970)
16. H.Fenner, P.Michaelis Arch. Pharm.
305, 751 (1972)
17. Pfizer Chas. & Co Inc. Fr. 1565.368
(Erf. J.M.Goldman) C.A. 72, 79076 (1970)
18. H. Fenner Arzneim. Forsch.
20, 1815 (1970)
19. H.Fenner, H.H.Rössler in "Flavins & Flavoproteins"
H.J.Duchstein, P.Hemmerich 1976, T.P.Singer, ed. Elsevier
Amsterdam, S. 343
20. R.Teichman Dissertation FU-Berlin
1976
21. K.Yagi, T.Ozawa, Nature
T. Nagatsu 184, 982 (1959)
22. S.Gabay, R.Harris Topics in Medicinal Chemistry
Vol. III (1967)
ed. J.L.Rabinowitz, R.M. Myerson
Interscience Publ. N.Y.
23. P.Hemmerich, C.Veeger Angew. Chem.
H.C.S.Wood 77, 699 (1965)
24. G.R.Penzer, G.K.Radda Quart Rev.
21, 43 (1967)
25. J.P.Lambooy Heterocyclic Compounds Vol. 9
Ed. R.C.Elderfield
Verl.: John Wiley & Sons Inc. N.Y.
1967
26. P.Hemmerich, G.Nagel- FEBS-Lett.
schneider, C.Veeger 8, 69 (1970)
27. A.H.Neims, L. Hellerman Ann. Rev. Biochem.
1970, 740

28. V.M.Berezovskii, L.S.Tul'chinskaya, N.A.Polyakova Russ. Chem. Rev.
41, 574 (1972)
29. R.S.Rivlin ed: Riboflavin
N.Y.: Plenum Press 1975
30. P.Hemmerich Fortschr. Chem. org. Naturst.
ed.: W.Herz, H.Griesebach, G.W.Kirby
Springer Verlag Wien, N.Y.
1976, 451
31. P.Hemmerich, A.Wessiak "Flavins & Flavoproteins
ed.: T.P. Singer
Verlag Elsevier, Amsterdam
1976, 9
32. W.Bauch Dissertation FU-Berlin
33. H.J.Duchstein, R.Grauert,
G.Blankenhorn, P.Hemmerich
M.Goldberg, I.Pecht FEBS-Lett.
in Druck
34. H.J.Duchstein Dissertation FU-Berlin
35. M.Brüstlein, T.C.Bruice J. Am. Chem. Soc.
94, 6548 (1972)
36. E.E.Edmondson, B.Barman,
G.Tollin Biochemistry
11, 1133 (1972)
37. J.Fischer, R.Spencer,
C.Walsh Biochemistry
15, 1054 (1976)
38. V.Massey, M.Stankovich im Druck
39. H.J.Duchstein, W.R.Knappe,
H.Fenner in Vorbereitung
40. M.Jorns, L.Hersh J. Am. Chem. Soc.
96, 4012 (1974)
41. M.Jorns, L.Hersh J. Biol. Chem.
250, 3620 (1975)
42. J.Fisher, C.Walsh J. Am. Chem. Soc.
96, 4345 (1974)

43. B.Averill, A.Schönbrunn
R.Abeles, L.Weinstock
C.Cheng, J.Fisher,
R.Spencer, C.Walsh. J. Biol. Chem.
250, 1603 (1975)
44. J.Fisher, C.Walsh J. Am. Chem. Soc.
96, 4345 (1974)
45. R.Burnett, G.Darling,
D.Kendell, M.Lequesne,
S.Mayhew, W.Smith, M.Ludwig J. Biol. Chem.
249, 4383 (1974)
46. H.H.Rössler Dissertation FU-Berlin 1974
47. T.C.Bruice Progress in Bioorganic Chemistry
ed.: E.T.Kaiser, F.J.Kezdy
Verlag Wiley N.Y.
1976,
48. Knoll AG, Chem Fabriken
(Erf. A.Westerman, O.Bub,
L.Suranyi) Ger 110 651 (4. Dez. 1958)
C.A. 56, 2461a (1962)
49. A.P.Phillips, N.B.Mehta
J.Z.Strelitz J. Org. Chem.
28, 1488 (1963)
50. E.A.Falco, B.Roth,
G.H.Hitchings J. Org. Chem.
26, 1143 (1961)
51. B.Roth, G.H.Hitchings J. Org. Chem.
26, 2770 (1961)
52. B.Roth, J.F.Bunnnett J. Am. Chem. Soc.
87, 334 (1965)
53. B.Roth, L.A.Schloemer J. Org. Chem.
28, 2659 (1963)
54. B.Roth, J.F.Bunnnett J. Am. Chem. Soc.
87, 340 (1965)
55. S.L.Jain, M.M.Mahandru
K.S.Narang Indian J. Chem.
7, 301 (1969)
56. H.Fenner Arzneim. Forsch.
20, 1815 (1970)

57. Y.Maki
Chem. Pharm. Bull.
22, 1265 (1974)
58. Pfizer Chas. & Co Inc.
(Erf. J.M.Goldman)
Fr. 1565 368
C.A. 72, 79076 (1970)
59. U.G.Granik, R.G.Glushkov
Khim. Farm. Zh.
5, 10 (1971)
60. G.Mazzone, G.Pappalardo
II Farmaco Ed. Sc.
25, 106 (1969)
61. Geigy Chem. Corp.
(Erf. W.Schindler, H.J.Peterli)
US. 3,010,961
C.A. 56, p 8729 f
62. M.Claasz
Chem. Ber.
45, 1015 (1912)
63. A.W.Hofmann
Chem. Ber.
20, 1788 (1887)
64. M.Janda, P.Hemmerich
Angew. Chem.
88, 475 (1976)
65. P.Hemmerich, B.Prijs,
H.Erlenmeyer
Helv. Chim. Acta
43, 372 (1960)
66. K.H.Dudley, A.Ehrenberg,
P.Hemmerich, F.Müller
Helv. Chim. Acta
47, 1354 (1964)
67. G.R.Penzer, G.K.Radda
Biochem. J.
1968, 259
68. W.H.Walker, P.Hemmerich
V.Massey
Helv. Chim. Acta
50, 2269 (1967)
69. H.Fenner, R.Grauert,
P.Hemmerich, M.Michel
in Vorbereitung
70. P.Hemmerich, B.Prijs,
H.Erlenmeyer
Helv. Chim. Acta
42, 1604 (1959)
71. P.Hemmerich, S.Ghisla,
U.Hartmann, F.Müller
"Flavins & Flavoproteins"
ed.: H.Kamin
Univ. Park Press, Baltimore 1971
S. 83

72. C.Jefcoate, S.Ghisla, P.Hemmerich J. Chem. Soc. (C)
1971, 1689
73. S.Ghisla, P.Hemmerich, C.Jefcoate J. Chem. Soc.
1972, 1564
74. S.Ghisla, L.Tauscher, P.Hemmerich Chimia
25, 413 (1971)
75. S.Ghisla, U.Hartmann, P.Hemmerich, F.Müller Liebigs Ann. Chem.
1973, 1388
76. H.Theorell Proceedings of the Fourth International
Congress of Biochemistry, Vienna
ed.: O.Hoffmann-Ostenhof
Pergamon Press, London Vol. VIII
1960, 275
77. G.Weber Biochem. J.
47, 114 (1950)
78. K.Yagi, Y.Matsuoka Biochem. Z.
328, 138 (1956)
79. W.H.Walker, P.Hemmerich Eur. J. Biochem.
V.Massey 13, 258 (1970)
80. H.Fenner, R.Grauert, P.Hemmerich, H.H.Rößler in Vorbereitung
81. L.Tauscher, S.Ghisla, P.Hemmerich Helv. Chim. Acta
56, 630 (1973)
82. J.D.Bell, J.F.Blount, O.V.Briscoe, H.S.Freeman Chem. Comm.
1968, 1656
83. R.G.Pearson J. Am. Chem. Soc.
85, 3533 (1963)
84. G.Klopman J. Am. Chem. Soc.
90, 233 (1968)
85. L.Michaelis, M.P.Schubert, C.V.Smythe J. Biolog. Chem.
116, 587 (1936)

86. L.Michaelis, G.Schwarzenbach J. Biol. Chem.
123, 527 (1938)
87. H.Beinert J. Am. Chem. Soc.
78, 5323 (1956)
88. F.Müller, P.Hemmerich
A.Ehrenberg "Flavins & Flavoproteins"
ed.: E.C.Slater
Verlag Elsevier Amsterdam 1966 S. 107
89. A.Ehrenberg, F.Müller
P.Hemmerich Eur. J. Biochem.
2, 286 (1967)
90. A.Ehrenberg, L.E.G.Erickson,
F.Müller "Flavins & Flavoproteins"
ed.: E.C.Slater
Verl.: Elsevier Amsterdam 1966 S.37
91. G.Palmer, F.Müller "Flavins & Flavoproteins"
ed.: E.C.Slater
Verlag Elsevier Amsterdam 1966 S. 123
92. A.Ehrenberg, L.E.G.Erickson,
J.S.Hyde "Flavins & Flavoproteins"
ed.: E.C.Slater
Verlag Elsevier Amsterdam 1966 S. 141
93. R.D.Draper, L.L.Ingraham Arch. Biochem. Biophys.
125, 802 (1968)
94. R.Kuhn, R.Ströbele Chem. Ber.
70, 753 (1937)
95. V.Massey, P.Hemmerich pers. Mitteilung
96. L.E.Brown, G.A.Hamilton J. Am. Chem. Soc.
92, 7225 (1970)
97. G.A.Hamilton Progress in Bioorganic Chemistry
ed.: E.T.Kaiser, F.J.Kezdy
Verlag Wiley N.Y. 1971 S.83
98. T.C.Bruice, L.Main,
S.Smith, P.Y.Bruice J. Am. Chem. Soc.
93, 7327 (1971)

99. T.C.Bruice "Flavins & Flavoproteins"
ed.: T.P.Singer
Verlag Elsevier, Amsterdam
1976, 244
100. P.Hemmerich, In "Enzymes: Structure and Function"
M.Schuman Jorns ed.: C.Veeger, J.Drenth, R.A.Ooster-
haan. Amsterdam FEBS-Symposia
29, 95 (1973)
101. H.I.X.Mager, W.Berends Rec. Trav. Chim.
84, 1329 (1965)
102. H.D.Becker, G.J.Mikol J. Am. Chem. Soc.
G.A.Russell 85, 3410 (1963)
103. T.Zincke, G.Siebert Chem. Ber.
48, 1242 (1915)
104. G.Pappalardo, G.Mazzone Boll. Sed. Accad. Gioenia. Sc.
Nat. Cat.
9, 5 (1967)
105. A.I.Kiprianow, Z.N.Pasenko Zhur. Obshchei. Khim.
19, 1523 (1949)
106. H.Biltz, T.Hamburger Chem. Ber.
49, 635 (1916)
107. K.Senga Chem. Pharm. Bull.
19, 2643 (1971)

LEBENS LAUF

- | | |
|----------------------|--|
| 4. 10. 1946 | geboren in Berlin als Sohn von Werner Grauert und seiner Ehefrau Ursula geb. Genter. |
| 1952 - 1958 | Grundschule in Berlin |
| 1959 - 1963 | Oberschule Technischen Zweiges in Berlin |
| 1964 - 1967 | Menzel-Oberschule Berlin-Tiergarten |
| 24. 2. 1967 | Abitur |
| 1967 - 1969 | Apotheken Praktikum |
| 26. 3. 1969 | Pharmazeutische Vorprüfung |
| SS 1969 -
WS 1972 | Studium der Pharmazie an der Freien universität Berlin |
| 24. 4. 1972 | Pharmazeutisches Staatsexamen |
| Okt. 1972 | Beginn der vorliegenden Dissertation |
| 1. 10. 1973 | Wissenschaftlicher Teilzeitassistent |
| 15. 11. 1975 | Wissenschaftlicher Assistent |

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30